

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE GENETISCHE ABHÄNGIGKEIT
DER PRODUKTION UND MODULATION DER
IMMUNGLOBULIN E-SYNTHESE IN VIVO UND IN VITRO**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Abteilung Biologie der
Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

PHILIPP PFEIFFER

im Februar 1983

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE GENETISCHE ABHÄNGIGKEIT
DER PRODUKTION UND MODULATION DER
IMMUNGLOBULIN E-SYNTHESE IN VIVO UND IN VITRO**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Abteilung Biologie der
Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

PHILIPP PFEIFFER

im Februar 1983

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE GENETISCHE KONTROLLE
DER PRODUKTION UND MODULATION DER
IMMUNGLOBULIN E-SYNTHESE IN VIVO UND IN VITRO

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
an der Universität Bonn
von
Philip Preisler



PHILIP PREISLER

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.83

Referent: Prof. Dr. W. König

Korreferent: Prof. Dr. R. Berzborn

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Ruhr-Universität Bochum (Direktor: Prof. Dr. W. Opferkuch) in der Arbeitsgruppe für Infekt-abwehrmechanismen unter der Leitung von Prof. Dr. W. König angefertigt.

Herrn Prof. Dr. König danke ich für die Überlassung des Themas, seine großzügige Unterstützung und Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Opferkuch und allen Mitarbeitern des Lehrstuhls danke ich für die Möglichkeit, die Einrichtungen des Instituts benutzen zu dürfen, und für die gute Zusammenarbeit.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

A. Abkürzungen

B. Einleitung

3

1. Immunglobulin E: molekularer Träger der allergischen Reaktion 3

1.1. IgE und der Begriff der Überempfindlichkeit 3

1.2. Struktur des IgE 4

1.3. IgE im Tiermodell 6

1.4. Messung von IgE 6

1.5. Der Stellenwert des IgE in der Immunologie 8

2. Zelluläre Grundlagen der IgE-Antikörperantwort 8

2.1. Immunkompetente Zellen der Immunantwort 8

2.2. Die T-Zellabhängigkeit der IgE-Antwort 10

2.3. Die Entstehung von IgE-sezernierenden Zellklonen 12

3. Die IgE-Antikörperantwort in vivo und in vitro 16

3.1. Die Kinetik der IgE-Antwort 16

3.1.1. Beobachtungen im Humanmodell 16

3.1.2. IgE-Produktion in der Ratte 17

3.1.3. IgE-Produktion im Kaninchen 18

3.1.4. IgE-Produktion in der Maus 19

3.2. Parasitäre Infektionen und die Produktion von IgE 21

3.2.1. Das Modellsystem der Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis* 22

3.2.1.1. Infektionsverlauf 22

3.2.1.2. Die IgE-Kinetik in der Infektion 24

3.2.2. Die Potenzierung der IgE-Antwort durch Wurminfektionen 25

3.3. Regulationsmechanismen der IgE-Antwort 30

3.3.1. Mechanismen zur Suppression und Steigerung der IgE-Antwort 30

3.3.2. IgE-spezifische lösliche Faktoren 31

3.3.2.1. Lösliche Faktoren aus Kaninchenzellen 31

3.3.2.2. Lösliche Faktoren aus normalen Mäusemilzzellen 31

	Seite
3.3.2.3. Lösliche Faktoren von Antigen-sensibilisierten Mäusemilzzellen	32
3.3.2.4. Lösliche Faktoren von Lymphozyten aus N.b.-infizierten Ratten	33
3.3.2.5. Lösliche Faktoren aus Serum und Aszites von Mäusen	37
3.3.3. Lymphokine in der Immunantwort	38
4. Die genetische Regulation der IgE-Antwort	41
4.1. Der MHC der Maus	42
4.2. Kontrolle der IgE-Antwort	45
5. Problemstellung	49
C. <u>Material und Methoden</u>	53
I. Material	53
I.1. Chemikalien und Gebrauchslösungen	53
I.2. Puffer und Lösungen	54
I.2.1. Physiologische Puffer	54
I.2.2. Puffer zur Plasmagewinnung	55
I.2.3. Reagenzien für die Jodierung von Proteinen	55
I.2.4. Lösungen für den Radioimmunoassay (RIA)	55
I.2.5. Reagenzien zur Proteinbestimmung nach Lowry	56
I.2.6. Reagenzien für die Immundiffusion nach Ouchterlony	56
I.2.7. Puffer für die Affinitätschromatographie	56
I.2.8. Puffer für die Herstellung von Immunsorbentien	57
I.3. Agar zur Larvengewinnung von N.b.	58
I.4. Medien zur Zellkultivierung	58
I.5. Mäuse	59
II. Methoden	59
II.1. Infektion mit Nippostrongylus brasiliensis (N.b.)	59
II.1.1. Der Infektionszyklus in der Ratte	59
II.1.2. Infektion von Mäusen	60
II.2. Gewinnung von Mäuseserum bzw. -plasma	60
II.3. Gewinnung von CFA (Complete Freund's Adjuvans)-Immunserum	61
II.4. Präparation von N.b.-Antigen	61
II.5. Passiv-cutane Anaphylaxie-Reaktion (PCA)	61

	Seite
II.6. Präparation der Immunadsorbentien	62
II.7. Immunglobuline der Maus	63
II.8. Antiseren	64
II.9. Markierung der Proteine mit ^{125}J	65
II.10. Radioimmunoassay (RIA)	66
II.10.1. Solid-Phase-RIA zur IgE-Bestimmung	66
II.10.2. RIA zur IgG ₁ -Bestimmung	68
II.11. In vitro Zellkulturen von Mäusezellen	68
II.11.1. Zellpräparation	68
II.11.2. Zellzählung	69
II.11.3. Viabilitätsbestimmung	69
II.12. Lymphozytentransformation	70
II.13. Proteinbestimmung	70
II.13.1. Photometrische Methode	70
II.13.2. Nach Lowry (1951)	71
II.14. Immundiffusion nach Ouchterlony (1958, 1962)	71
II.15. Ammoniumsulfatpräzipitation von Mäuseseren	71
II.16. Indirekte Immunfluoreszenz	72
D. <u>Ergebnisse</u>	73
I. Die IgE-Antikörperantwort gegen N.b. in vivo	73
I.1. Studien über die spezifische IgE-Produktion	73
I.1.1. Die Austestung von 36 verschiedenen Mäusestämmen	73
I.1.1.1. Die Stärke der IgE-Immunantwort: Einteilung in Respondergruppen	75
I.1.1.1.1. Die Kinetik der spezifischen IgE-Ant- wort der Highresponder-Mäuse (HR)	78
I.1.1.1.2. Die Kinetik der spezifischen IgE-Ant- wort der Mediumresponder-Mäuse (MR)	78
I.1.1.1.3. Die Kinetik der spezifischen IgE-Ant- wort der Lowresponder-Mäuse (LR)	78
I.1.1.1.4. Die Untersuchung von Einzeltieren	82
I.1.1.2. Die Manifestation der Infektion in den Inzuchtmäusen	86
I.1.1.3. Die genetische Abhängigkeit der Bildung von spezifischem IgE	86
I.1.1.3.1. Der H-2-Haplotyp und die IgE-Produktion	86
I.1.1.3.2. Die IgE-Antwort von F1-Hybridmäusen	90

	Seite
I.1.2. Die Modulation der spezifischen IgE-Antwort durch Mäuseseren	94
I.1.2.1. Der Einfluß von NR-Serum auf HR-Mäuse	94
I.1.2.2. Der Einfluß von LR-Serum auf HR-Mäuse	97
I.1.3. Kurzzusammenfassung: antigenspezifische IgE-Produktion	98
I.2. Studien über die totale IgE-Produktion	98
I.2.1. Die Produktion von IgE im Infektionszyklus	98
I.2.1.1. Die IgE-Produktion nicht N.b.-infizierter Mäuse	99
I.2.1.2. Der Verlauf der totalen IgE-Produktion im Infektionszyklus	101
I.2.1.3. Die Kinetik der totalen IgE-Produktion in der Reinfektion	101
I.2.1.3.1. Highresponder-Mäuse	101
I.2.1.3.2. Andere Respondergruppen	105
I.2.1.4. Die totale IgE-Produktion beim Vergleich der Respondergruppen	105
I.2.2. Die Untersuchung von Einzeltieren	107
I.2.2.1. Individualtiter und Geschlechtsspezifität	107
I.2.2.2. Vergleich von Poolseren mit den Mittelwerten	107
I.3. Die Antikörperproduktion gegen N.b.	111
I.3.1. Der Vergleich von spezifischer und totaler IgE-Produktion	111
I.3.2. Die Einbeziehung der spezifischen und totalen IgG ₁ -Produktion	113
I.3.3. Die Produktion von spezifischen Ig-Antikörpern gegen N.b. (fluoreszenzserologische Untersuchungen)	115
I.4. Zusammenfassung der in vivo-Experimente	117
II. Die IgE-Antikörperantwort gegen N.b. in vitro	118
II.1. Methodik der in vitro-Experimente	118
II.1.1. Versuchsaufbau und Zielsetzung	118
II.1.2. Untersuchte Mäuse	118
II.1.3. Zellen, Zellzahl, Meß-System	119
II.1.4. Kulturdauer und Viabilität	121
II.2. Nachweis von spezifischem IgE in vitro	123
II.3. Die Synthese von IgE in vitro und die Versuche zur Modulation der IgE-Synthese	124

	Seite
II.3.1. IgE-Synthese im Verlauf der N.b.-Infektion	124
II.3.2. Modulation der IgE-Synthese durch Mitogene	127
II.3.2.1. Einfluß von Pokeweedmitogen (PWM) auf die IgE-Synthese	127
II.3.2.1.1. Ermittlung der optimalen Mitogenkonzentration	127
II.3.2.1.2. PWM-Einfluß im Verlauf der N.b.-Infektion	128
II.3.2.1.2. a) Hybridmäuse	128
II.3.2.1.2. b) HR-Mäuse	131
II.3.2.1.2. c) Bestrahlte NR-Mäuse	133
II.3.2.2. Abhängigkeit der IgE-Synthese von Lipopolysaccharid (LPS)	134
II.3.2.2.1. Ermittlung der optimalen Mitogenkonzentration	134
II.3.2.2.2. LPS-Einfluß im Verlauf der N.b.-Infektion	134
II.3.2.2.2. a) Hybridmäuse	134
II.3.2.2.2. b) HR-Mäuse	138
II.3.2.2.2. c) Bestrahlte NR-Mäuse	138
II.3.2.3. IgE-Synthese unter Concanavalin A (ConA)-Einfluß	138
II.3.2.3.1. Ermittlung der optimalen Mitogenkonzentration	138
II.3.2.3.2. ConA-Einfluß im Verlauf der N.b.-Infektion	141
II.3.2.3.2. a) Hybridmäuse	141
II.3.2.3.2. b) HR-Mäuse	141
II.3.2.3.2. c) Bestrahlte NR-Mäuse	143
II.3.2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse mit verschiedenen Mitogenen	143
II.3.2.4.1. Mitogeneinfluß in Abhängigkeit von der N.b.-Infektion	145
II.3.2.4.2. Vergleich der verschiedenen Mitogene und ihrer Wirkung	145
II.3.3. Modulation der IgE-Synthese durch N.b.-Antigen	147
II.3.3.1. F1-Mäuse	148
II.3.3.1.1. IgE-Synthese unter dem Einfluß von N.b.-Homogenat	148
II.3.3.1.2. IgE-Synthese unter dem Einfluß von N.b.-Kulturüberstand	150
II.3.3.1.3. Vergleich von IgE-Synthese und Lymphozytentransformation unter N.b.-Antigen-Einfluß	150

II.3.3.2. HR-Mäuse	153
II.3.3.3. Bestrahlte NR-Mäuse	155
II.3.3.3.1. IgE-Synthese unter N.b.-Homogenat-Einfluß	155
II.3.3.3.2. IgE-Synthese unter dem Einfluß von N.b.-Kulturüberstand	155
II.3.3.3.3. Vergleich von IgE-Synthese und Lymphozytentransformation unter N.b.-Antigen-Einfluß	157
II.3.3.4. Zusammenfassung	160
II.3.4. Die Modulation der IgE-Synthese durch Serum	161
II.3.4.1. Der Einfluß verschiedener Mäuseseren auf die in vitro IgE-Synthese von Zellen aus der N.b.-Infektion	161
II.3.4.1.1. B10.G-Serum	161
II.3.4.1.2. Balb/c-Serum	166
II.3.4.2. Vergleich des Einflusses verschiedener Mäuseseren auf die IgE-Synthese und Stimulierbarkeit von A.CA-Zellen	168
II.3.4.3. Der Einfluß von Fötalem Kälberserum (FCS) auf die IgE-Synthese	170
II.3.4.4. Fraktionierung von Mäuseseren und der Einfluß dieser Serumfraktionen auf die IgE-Synthese und Lymphozytentransformation	172
II.3.4.4.1. Die Produktion von IgE unter dem Einfluß von Serumfraktionen	174
II.3.4.4.2. Vergleich der Suppression von IgE-Synthese und Lymphozytentransformation durch Serumfraktionen	176
II.3.4.4.3. Die Suppressivität der Serumfraktionen im Verhältnis zur Proteinkonzentration	179
II.3.4.5. Zusammenfassung der Ergebnisse mit Mäuseseren und -serumfraktionen	184
II.4. Zusammenfassung der in vitro-Experimente	185

E. Diskussion

I. IgE-Antikörperantwort gegen N.b. in vivo	186
I.1. Die spezifische IgE-Produktion	186
I.2. Die totale IgE-Produktion	189
I.3. Die Produktion von IgG ₁ sowie die Bildung spezifischer Antikörper gegen N.b.	192
I.4. Die genetische Regulation der IgE-Bildung	193
I.5. Die Modulation der spezifischen IgE-Antwort in vivo durch Mäuseserum	199

	Seite
II. Die IgE-Synthese in vitro	202
II.1. Die spontane IgE-Antikörperproduktion im Verlauf der N.b.-Infektion	202
II.2. Der Einfluß verschiedener Mitogene auf die IgE-Synthese	204
II.3. Die Wirkung von parasitären Antigenen	206
II.4. Die Modulation der IgE-Synthese durch Mäuserum bzw. Serumfraktionen	208
II.5. Relevanz der experimentell gefundenen Daten für die bestehenden Vorstellungen über die IgE-Regulation unter besonderer Berücksichtigung der IgE-Bildung bei parasitären Infektionen	211
F. <u>Zusammenfassung</u>	217
G. <u>Literaturverzeichnis</u>	221

A. Abkürzungen

BBS	Borate Buffered Saline
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BCGF	B Cell Growth Factor
BGG	Bovine Gamma Globulin
BPO	Benzylpenicilloyl
BSA	Bovine Serum Albumin
CFA	Complete Freund's Adjuvant
Ci	Curie
CML	Cell Mediated Lymphotoxicity
ConA	Concanavalin A
cpm	Counts per Minute
CSF	Colony Stimulating Factor
DNP	Dinitrophenol
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTH	Delayed Type Hypersensitivity
EDTA	Äthylendiamintetraazetat
EFA	Enhancing Factor of Allergy
EPF	IgE Potentiating Factor
ESF	IgE Suppressive Factor
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HEPES	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N-2-äthansulfonsäure
HR	Highresponder
HS	Horse Serum
HSF	Histamine Sensitizing Factor
IFA	Incomplete Freund's Adjuvant
IFN _γ	Immun-Interferon
Ig	Immunglobulin
IL1	Interleukin 1
IL2	Interleukin 2
i. p.	intraperitoneal
Ir-Gen	Immune-Response Gen
IU	Internationale Einheit
i. v.	intravenös
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanine
KNS	Kaninchennormalserum

LPS	Lipopolysaccharid
LR	Lowresponder
MHC	Major Histocompatibility Complex
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
(m)M	(Milli)Mol
min.	Minute
MLN	Mesenteric Lymph Node
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction
MR	Mediumresponder
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N.b.	Nippostrongylus brasiliensis
NMS	Normal Mouse Serum
NR	Nonresponder
OA	Ovalbumin (Eieralbumin)
OM	Ovomucoid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Passive Cutaneous Anaphylaxis
pg	Pikogramm
PHA	Phytohemagglutinin
PPD	Purified Protein Derivative
PWM	Pokeweed Mitogen
R	Röntgen
RAST	Radio Allergosorbent Technik
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s. c.	subcutan
SFA	Suppressive Factor of Allergy
SI	Stimulationsindex
TRF	T Cell Replacing Factor

B. Einleitung

B.1. Immunglobulin E: molekularer Träger der allergischen Reaktion

B.1.1. Immunglobulin E und der Begriff der Überempfindlichkeit

Seit der Entdeckung des Immunglobulin E (IgE) im Serum von Patienten, die an Heufieber und Asthma erkrankt waren (Ishizaka, Ishizaka und Hornbrook, 1966) und seiner Charakterisierung als eigenständige Immunglobulinklasse (Ishizaka und Ishizaka, 1967), erlangten die Untersuchungen der IgE-Antikörperproduktion in der Immunologie große Bedeutung.

Es hatte sich schon früh gezeigt (Portier und Richet, 1902), daß die traditionelle Betrachtungsweise der Immunreaktion als Abwehrleistung und Schutz eines Organismus' gegenüber dem Eindringen fremder Stoffe, den sogenannten Antigenen, zu einseitig war. Immunreaktionen können nämlich sowohl auf zellulärer wie auch auf humoraler Ebene Formen annehmen, die dem Körper schaden können; systemische oder lokale Gewebsschäden, Schock, sowie Herz- und Kreislaufversagen können die Folge sein.

Coombs und Gell (1975) teilten diese als Überempfindlichkeitsreaktionen (Hypersensibilität) bzw. allergische Reaktionen bezeichneten Erscheinungen in vier Typen ein: Typ I = anaphylaktische, Typ II = zytotoxische, Typ III = komplexvermittelte und Typ IV = zellvermittelte Reaktion. Diese Einteilung stellt allerdings keine starre Klassifizierung dar; ihr liegt das gedankliche Konzept zugrunde, daß jede bislang bekannte Immunreaktion, die durch die Typen I bis IV erfaßt werden kann, in der Lage ist, über die gleichen Mechanismen auch Schadensreaktionen zu induzieren. Diese Klassifizierung stellt für klinische und experimentelle Untersuchungen das beste gedankliche Gerüst dar; es kann damit jedoch nicht das Zusammenspiel der Komponenten und Systeme untereinander erklären (König, Pfeiffer und Pison, 1981).

Die Typ I-Reaktion, auch anaphylaktische Reaktion genannt, wird durch das Immunglobulin E vermittelt (Ishizaka, 1976; Ishizaka und Ishizaka, 1978), welches zu den homozytotropen Antikörpern

gehört. Diese besitzen die Eigenschaft, einen Organismus derselben Spezies sensibilisieren zu können, von der sie produziert wurden. Im Gegensatz dazu können die heterozytotropen Antikörper nur Organismen einer fremden Spezies sensibilisieren. Es werden zwei Typen innerhalb der homozytotropen Antikörper unterschieden (Mota, 1981 b), die in allen untersuchten Spezies auftreten und in ihren physikochemischen und biologischen Eigenschaften differieren. Eine Gruppe der homozytotropen Antikörper gehört sämtlich zu Subklassen des Immunglobulin G (Bloch, 1967; Bloch, 1973). Sie zeichnet sich durch hohe Serumtitern, Hitzeresistenz und Beständigkeit gegenüber alkalischer Reduktion aus, weist eine kurze Sensibilisierungszeit von 2 bis 4 Stunden und - nach passiver Sensibilisierung - eine maximale Persistenz im Gewebe von 24 bis 72 Stunden auf. Im Gegensatz dazu kennzeichnet die homozytotropen Antikörper der IgE-Klasse eine sehr geringe Serumkonzentration, Hitzelabilität und Unbeständigkeit gegenüber alkalischer Reduktion. Diese Antikörper besitzen eine optimale Sensibilisierungszeit von 48 bis 72 Stunden und verweilen nach passiver Sensibilisierung 2 bis 3 Wochen im Gewebe (Mota, 1981 b).

B.1.2. Struktur des IgE

Das Auftreten von zwei Myelom-IgE Fällen, ND und PS (Johansson und Bennich, 1967; Ogawa, Kochwa, Smith, Ishizaka und McIntyre, 1969) erlaubte eine genaue strukturelle Analyse des Immunglobulins. IgE hat ein Molekulargewicht von 190 000 dalton, wovon 12 % auf Kohlenhydratanteile entfallen, und eine Sedimentationskonstante von 7,29 S (König, Theobald, Möller, Pfeiffer und Bohn, 1981). Die Struktur des IgE ist mit der von Immunglobulin G analog; beide Immunglobuline unterscheiden sich allerdings durch die molekulare Struktur der schweren Ketten (Abb. 1).

Immunglobulin G besitzt drei Domänen (konstante Homologieregionen) auf der schweren Kette, dagegen wird beim Immunglobulin E eine zusätzliche C4-Domäne ausgebildet (Conrad und Froese, 1976). Eine bedeutende Eigenschaft dieses Immunglobulins ist die hohe Affinität, sich an spezielle Rezeptoren von Mastzellen und basophilen Leukozyten zu binden (Ishizaka und Ishizaka, 1975; Metzger, 1977), wobei die Bindung des IgE über seinen Fc-Teil

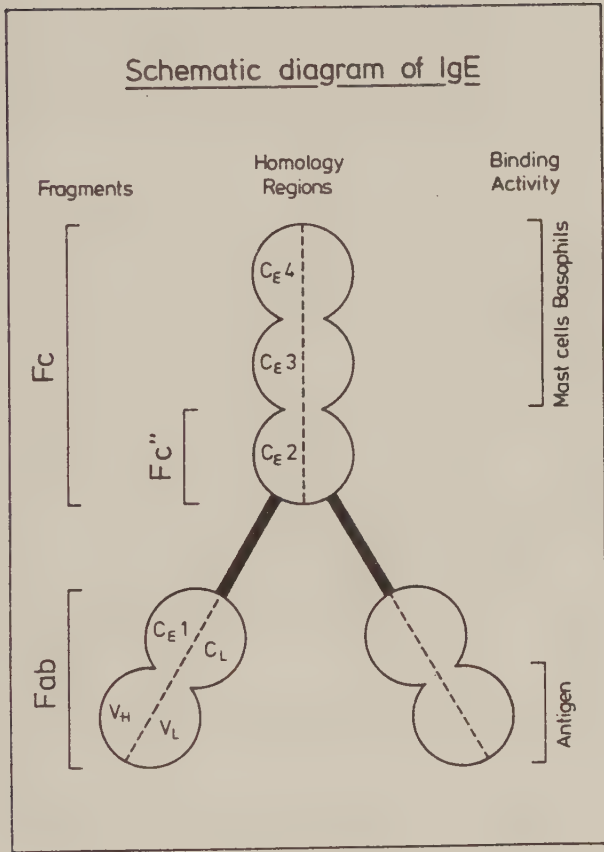


Abb. 1: Schematische Darstellung der IgE-Struktur.
C₁ - C₄: konstante Homologieregionen der schweren Kette; C_L: konstante Region der leichten Kette; V_H, V_L: variable Regionen der schweren (H) bzw. leichten (L) Kette (aus: König und Pfeiffer, 1981).

erfolgt (König und Ishizaka, 1976; Ishizaka, Ishizaka und Lee, 1970; Dorrington und Bennich, 1978). Die Interaktion des zellgebundenen IgE mit dem homologen Antigen führt zur Mediatorenfreisetzung aus den Mastzellen; die Kaskade der Folgereaktionen bewirkt die Manifestation von allergischen Reaktionen (König, 1977).

B.1.3. IgE im Tiermodell

Homozytrophe Antikörper, die dem menschlichen IgE entsprechen, sind auch schon früh im Tiermodell beschrieben worden. Als erste wiesen Mota (1964) sowie Binaghi und Benacerraf (1964) sogenannte 'reagine' Antikörper in Ratten nach, die mit Antigen und Bordetella pertussis Vakzine immunisiert worden waren. Sensibilisierende Antikörper wurden auch in Kaninchen (Ishizaka, Ishizaka und Hornbrook, 1970; Lindquist, 1968; Zvaifler und Becker, 1966), Hund (Rockey und Schwartzman, 1967), Maus (Mota, 1967; Mota und Peixoto, 1966; Prouvost-Danon, Binaghi, Rochas und Boussac-Aron, 1972), Affe (Ishizaka, Ishizaka und Tada, 1969), Meerschweinchen (Levine, Chang und Vaz, 1971), Schwein (Barrett, 1969) und Kuh (Hammer, Kirkhofen und Schmid, 1971) gefunden. Es zeigte sich, daß die reaginen Antikörper im Experimentaltier hinsichtlich ihrer physiko- und immunchemischen Eigenschaften denen des menschlichen IgE gleichen und ihr Molekulargewicht ebenfalls von dem der anderen Isotypen verschieden ist (Ishizaka, 1976). Die Identifizierung von IgE-Antikörpern im Tiermodell eröffnete somit die Möglichkeit, die Fragen hinsichtlich der Produktion und Regulation dieser für allergische Erkrankungen so bedeutsamen Substanz in den verschiedensten Experimentalmodellen zu untersuchen.

B.1.4. Messung von IgE

Schon im Jahre 1921 hatten Prausnitz und Küstner gezeigt, daß die Eigenschaft eines Serums zur Sensibilisierung durch die intradermale Injektion des Serums eines Allergikers auf eine Normalperson übertragen werden konnte. Dieser Prausnitz-Küstner-Test ist die klassische Methode, um reagine Antikörper nachzuweisen. Erst nach der Entdeckung des IgE, seiner Anreinigung

und der Herstellung von Antiseren gegen dieses Immunglobulin war es möglich, eine Methode (die Radio-Allergosorbent-Technik = RAST) zur Messung von IgE in vitro zu entwickeln (Wide, Bennich und Johansson, 1967; Johansson, Bennich und Berg, 1971). Der Test beruht auf der Verwendung von radioaktiv markiertem anti-IgE und somit konnte dieses System verwendet werden, nachdem IgE als reines Antigen isoliert und für die Herstellung eines Antiserums verfügbar war.

Im Tiermodell wurde dies erstmalig möglich, als die Entdeckung von Ratten-Myelom-IgE beschrieben worden war (Bazin, Beckers und Querinjean, 1974). In vivo ist der gebräuchliche Nachweis von reaginen Antikörpern im Tiermodell eine Methode, die auf dem gleichen Prinzip wie der Prausnitz-Küstner-Test basiert, die passiv cutane Anaphylaxie-Reaktion (Ovary, 1964). Diese Methode bestimmt den IgE-Antikörpertiter gegen ein definiertes Antigen, weist also spezifisches IgE nach. Die quantitative Bestimmung von totalem IgE im Serum kann in vitro mit einem der RAST-Technik analogen System nunmehr auch für Maus-IgE durchgeführt werden. In den letzten Jahren wurde es durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern möglich, Hybridomzell-Linien, die Mäuse-IgE sezernieren, zu produzieren (Böttcher, Hämmerling und Knapp, 1978; Böttcher, Ulrich, Hirayama und Ovary, 1980; Eshhar, Ofarim und Waks, 1980; Liu, Bohn, Ferry, Yamamoto, Molinaro, Sherman, Klinman und Katz, 1980; Bohn und König, 1982 a, 1982 b).

Wie schon erwähnt (Kap. B.1.1.), sind homozytrophe Antikörper im Serum nur in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar. Die Serumkonzentration des IgE liegt beim Menschen normalerweise zwischen 100 - 700 ng/ml, bei Allergikern können Werte von 3000 ng/ml und mehr erreicht werden (König, Henn und Stockinger, 1978). Die Untersuchungen von Jarrett und Bazin ergaben eine totale IgE-Konzentration im Rattenserum von weniger als 350 ng/ml (Jarrett und Bazin, 1974); dies entspricht auch der Konzentration im Mäuseserum (Chen, Bohn, Liu und Katz, 1981).

B.1.5. Der Stellenwert des IgE in der Immunologie

Aufgrund seiner Rolle in der Pathogenese der IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen kommt dem System der IgE-Antikörperantwort große Bedeutung für die klinische Immunologie und Allergologie zu.

Die IgE-Produktion und -Regulation ist aber auch für die immunologische Grundlagenforschung sehr wichtig, da dieses Modell viele charakteristische Merkmale aufweist, die zum Beispiel bei der IgG-Antikörperantwort nicht so klar zu Tage treten (Ishizaka, 1976). Es hat sich weiterhin herausgestellt, daß die Aufklärung von Kontrollmechanismen, welche die IgE-Synthese regulieren, einen tiefen Einblick in die Beschaffenheit der generellen regulatorischen Vorgänge im Immunsystem auf genetischer, zellulärer und molekularer Ebene gewährt (Katz, 1980). Im folgenden soll daher der Stand der Forschung anhand einiger wesentlicher, für die IgE-Antikörperbildung charakteristischer, Komponenten dargelegt werden, die für das in dieser Arbeit untersuchte Teilgebiet von grundlegender Bedeutung sind.

B.2. Zelluläre Grundlagen der IgE-Antikörperantwort

B.2.1. Immunkompetente Zellen der Immunantwort

Die durch den Kontakt mit einem Immunogen im Organismus ausgelösten Vorgänge und die daran beteiligten Zellen können wie folgt beschrieben werden. Nach der Bildung im Knochenmark wandern die Vorläuferzellen der Lymphozyten in zwei zentrale Lymphalorgane, wo sie während der Weiterdifferenzierung und Spezialisierung ihre immunologischen Fähigkeiten erwerben und nach Bildung immunkompetenter Lymphozyten in bestimmte Regionen der peripheren Lymphalorgane (Milz, Lymphknoten) wandern bzw. im Organismus zirkulieren. Lymphozyten, die auf ihrer Wanderung den Thymus durchlaufen, werden als T-Lymphozyten (T-Zellen) bezeichnet. Diejenigen Zellen, die über ein bei den Säugern noch nicht näher charakterisiertes Organ, das der Bursa Fabricii der Vögel entspricht, wandern, differenzieren zu B-Lymphozyten (B-Zellen) aus (Mota, 1981 a). Eigenschaft dieser B-Zellen ist

es, auf ihrer Oberfläche Antikörper (= Immunglobulinmoleküle) zu exprimieren. Sie sind die Vorläuferstadien von Zellen, die nach erfolgter Aktivierung und Ausdifferenzierung der B-Lymphozyten dann als Plasmazellen bestimmte Immunglobuline sezernieren. Dagegen produzieren T-Zellen keine Antikörper, die in das Serum sekretiert werden, besitzen aber antigenerkennende Rezeptoren auf ihrer Oberfläche.

Man kann die peripheren T-Zellen anhand der von ihnen unterschiedlich ausgeprägten Oberflächenmarkern, den Lyt-Antigenen, in Subklassen unterteilen. Diese Antigene - Lyt 1, 2 und 3 - stellen antigene Determinanten der Zellmembran dar und werden ausschließlich von T-Lymphozyten ausgeprägt. Dabei werden drei verschiedene Klassen unterschieden (Sehon, 1982): T-Zellen, die alle drei Antigene (Lyt 1⁺ 2⁺ 3⁺) ausprägen (Ly 123-Zellen) sowie Ly1- und Ly23-Zellen; es besteht ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung von Oberflächenmarkern und der Funktion, die diese T-Zellen ausüben. T-Helferzellen tragen das Ly1⁺-Antigen, T-Suppressorzellen gehören den Ly2⁺3⁺-Zellen an, während die Ly1⁺2⁺3⁺-Zellen Vorläufer der beiden anderen Klassen darstellen.

Für die Induktion einer Antikörperantwort ist das Zusammenwirken von T- und B-Lymphozyten unentbehrlich, was am Beispiel der Antikörperantwort von Mäusen gegen bestimmte Antigene (Schafserythrozyten, Proteine) gezeigt wurde (Miller und Michell, 1969). Auch wurde im Mäusemodell bei der Bildung von Antikörpern gegen Haptene (Mitchison, Rajewsky und Taylor, 1971) und ebenso im Meerschweinchen- und Kaninchensystem (Katz, Paul, Goidl und Benacerraf, 1970) für die anti-Hapten IgE- und IgM-Antwort die Kooperation beider Lymphozytenpopulationen demonstriert.

Bei der haptenspezifischen Antikörperantwort werden die T-Zellen üblicherweise mit den Determinanten des Trägermoleküls (Carrier), an das die Haptene gekuppelt sind, 'geprimt'. Diese 'geprimten' T-Helferzellen kooperieren dann mit B-Zellen, die Immunglobulinrezeptoren für das Hapten besitzen, und induzieren so die anti-Hapten Antikörperproduktion. Andererseits existiert auch eine Subpopulation von T-Suppressorzellen; bestimmte mit dem Träger 'geprimte' Zellen üben einen inhibitorischen Einfluß auf hapten-spezifische B-Zellen aus (Tada, 1975). Neben den B- und T-Lympho-

zyten kommt auch den Makrophagen - besonders bei der Präsentation von Antigen für die immunkompetenten Lymphozyten - große Bedeutung zu (Unanue, 1972). Die Interaktionen zwischen diesen Zellpopulationen werden zum großen Teil durch lösliche Faktoren vermittelt und gesteuert. Solche löslichen Faktoren wirken als Kommunikationssignal zwischen den Zellen, von denen sie produziert werden und denjenigen Zellen, die die passenden Empfängerstrukturen aufweisen. Eine Vielzahl solcher immunregulatorischen Faktoren kann durch Stimulation mit bestimmten Antigenen oder Mitogenen, in vivo und in vitro, erzeugt werden (Altman und Katz, 1980). Die Faktoren werden von T-, B-Zellen oder Makrophagen produziert. Sie können fördernde oder suppressive Einflüsse auf die Immunantwort ausüben und sind antigenspezifisch oder nichtspezifisch. Weiterhin können sie antigene Determinanten, die im MHC-Komplex kodiert sind, tragen und in ihrer Wirkung auf die Zielzellen der Steuerung über den MHC-Komplex unterliegen oder auch nicht. Die löslichen Faktoren, welche selektiv auf die IgE-Antikörperantwort wirken, werden in einem gesonderten Kapitel (B.3.3.2., S. 31), beschrieben.

Auch für die Induktion der IgE-Antikörperantwort ist eine Interaktion von T- und B-Zellen erforderlich, wie in Arbeiten mit Hapten-Carrier-Systemen gezeigt wurde (Hamaoka, Katz und Benacerraf, 1973; Okudaira und Ishizaka, 1973 b, 1973 c; Kishimoto, Hirai, Suemura und Yamamura, 1976; Kimoto, Kishimoto, Noguchi, Watanabe und Yamamura, 1977). So können die charakteristischen Erscheinungsformen der IgE-Antwort, die nicht so leicht in der IgG- und IgM-Antikörperantwort beobachtet werden können, auf das Vorhandensein dieser für die IgE-Klasse charakteristischen, spezifischen T-Helfer- und -Suppressorzellen zurückgeführt werden.

B.2.2. Die T-Zellabhängigkeit der IgE-Antwort

Die Abhängigkeit der IgE-Produktion von T-Zellen konnte im Rattenmodell eindeutig dadurch gezeigt werden, daß Ratten, denen der Thymus innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Geburt entfernt worden war, auf nachfolgende Immunisierungen mit einem Hapten-Carrier-Konjugat nicht mit der Produktion von IgE-

Antikörpern antworten konnten (Okumura und Tada, 1971 a). Injizierte man den thymektomierten Tieren normale oder auch carrier-geprimte Thymozyten, so waren sie in der Lage, anti-Hapten IgE-Antikörper zu produzieren (Taniguchi und Tada, 1974). Der gleiche Effekt konnte auch im Mäusesystem nachgewiesen werden. Es gibt Mäuse, die einen Tymusdefekt aufweisen, d. h. denen von Geburt an der Thymus fehlt (nu/nu-Mäuse). Diese Tiere besitzen nicht die Fähigkeit, IgE gegen Ovalbumin zu produzieren. Nach Injektionen von Thymozyten oder der Transplantation von Thymus konnte jedoch die IgE-Antikörperproduktion induziert werden (Michael und Bernstein, 1973). Ein weiterer klassischer Versuch zur T-B-Zellkooperation wurde mit Ratten durchgeführt (Tada, Okumura und Taniguchi, 1974). Tiere, die mit einer tödlichen Röntgendosis bestrahlt worden waren, wurden anschließend durch Knochenmarktransplantation oder mit Knochenmarks- und Thymustransplantaten zusammen rekonstituiert. Während die Ratten, denen nur Knochenmark implantiert worden war, keine IgE-Antikörper produzieren konnten, waren dagegen diejenigen Tiere, die auch Thymuszellen erhalten hatten, befähigt, IgE gegen ein Hapten-Carrier-Konjugat zu produzieren.

Neben diesen direkten Techniken zum Nachweis des T-Zelleinflusses auf die IgE-Antwort, wurde auch in anderen Modellen die Rolle der T-Zellen bei der Bildung von Immunglobulin E gezeigt. So konnte im Ratten-, Kaninchen- und Mäusesystem nachgewiesen werden, daß eine vorherige Immunisierung mit dem Carrierantigen allein, bei Anwendung einer geeigneten Dosis und Wahl des richtigen Zeitpunktes, die haptenspezifische IgE-Antwort steigern kann. Dies ist ein weiterer Nachweis, daß die anti-Hapten Antikörperbildung in der Anwesenheit von einer bestimmten Anzahl von carrierspezifischen T-Zellen abläuft (Tada, 1975). Die IgE-Antikörperbildung von Ratten gegen DNP-Ascaris wurde beobachtet; wenn den Tieren fünf Tage nach Immunisierung mit Ascarisextrakt und Bordetella pertussis Vakzine das DNP-Ascaris Hapten-Konjugat injiziert wurde (Tada und Okumura, 1971 b). Ebenso führte das 'Priming' von Kaninchen mit Ascarisextrakt - verabreicht in Aluminiumhydroxyd vier Wochen vor der Immunisierung mit DNP-Ascaris - sowohl zu einer IgE- wie auch IgG-

Antwort gegen DNP (Kishimoto und Ishizaka, 1973 a). Der gleiche Effekt wurde auch bei DBA/1-Mäusen durch 'Priming' mit Eieralbumin in komplettem Freund's Adjuvans erreicht, so daß die zwei Wochen später folgende Immunisierung mit DNP-Eieralbumin zu einer IgE-Antwort gegen DNP führte (Ishizaka und Okudaira, 1973). Ein weiteres Experiment mit DBA/1-Mäusen unterstrich, daß für die maximale anti-Hapten IgE-Antwort sowohl hapten-spezifische B-Zellen als auch carrierspezifische Helferzellen notwendig sind (Okudaira und Ishizaka, 1973).

Abschließend sei noch ein Experiment zur T-B-Zellkooperation bzw. der T-Zellabhängigkeit der IgE-Antikörperantwort dargestellt, das im Mäusesystem mit Hilfe eines adoptiven Zelltransfers durchgeführt wurde (Hamaoka, Katz und Benacerraf, 1973). Zwei Gruppen von Spendermäusen wurden mit DNP-KLH oder -Ascaris-extrakt in Adjuvans immunisiert und die Milzzellen dieser Tiere in syngene, bestrahlte Empfänger-mäuse transferiert. Nach dem adoptiven Zelltransfer und der Gabe von DNP-KLH produzierten die mit DNP-KLH geprimten Milzzellen hohe anti-DNP IgE- und IgG-Antworten, aber nur sehr geringe gegen DNP-Ascaris. Wurden dagegen Milzzellen von Ascaris 'geprimten' Zellen transferiert, konnte auch nach Gabe von DNP-Ascaris eine IgE- und IgG-Antikörperantwort beobachtet werden. Die Fähigkeit der Kooperation der Ascaris-'geprimten' Milzzellen mit den DNP-KLH geprimten Lymphozyten konnte ausgeschaltet werden, wenn die Milzzellen mit anti-Thy1 Antiserum und Komplement behandelt wurden. Ein Beweis, daß die carrierspezifischen Helferzellen für die IgE-Antikörperantwort die auf ihrer Oberfläche das Thy1-Antigen tragenden T-Zellen sind.

B.2.3. Die Entstehung von IgE-sezernierenden Zellklonen

Vorausgehend wurde die Kooperation zwischen B- und T-Zellen und die T-Zellabhängigkeit der IgE-Antikörperantwort dargelegt. In den letzten Jahren ist es auch gelungen, die Entwicklung von B-Lymphozyten zu IgE-sezernierenden Zellen näher zu charakterisieren. Dies ist ein wichtiger Beitrag zu weiteren Arbeiten über die Regulation der IgE-Antikörpersynthese auf der B-Zellebene.

Im Mäusesystem wurde bei Studien über die Oberflächenimmunglobuline der B-Zellen nachgewiesen, daß Vorläuferstadien von B-Lymphozyten IgM auf der Oberfläche tragen und diejenigen Lymphozyten, die andere Isotypen tragen, von diesen IgM-tragenden Zellen abstammen (Ishizaka, 1981). Aus anderen Untersuchungen ist bekannt, daß Lymphozyten, die IgG bzw. IgA exprimieren, für die Synthese dieser Isotypen festgelegt sind (Warner, 1974). Dieses Prinzip ist auch auf das IgE-System übertragbar; es wurden sowohl in Ratten wie auch Mäusen IgE-tragende Lymphozyten nachgewiesen (Ishizaka, Urban und Ishizaka, 1976). Diese Autoren konnten zeigen, daß 2 bis 5 % der Gesamtzellpopulation bzw. 10 bis 20 % aller B-Zellen der mesenterialen Lymphknoten (MLN) von Ratten aus IgE-tragenden Lymphozyten bestehen. Sie konnten auch demonstrieren, daß in Mäusen ungefähr 3 % der Milzzellen und 2 % der MLN-Zellen IgE exprimieren. Nach einer Infektion mit dem Parasiten *Nippostrongylus brasiliensis* zeigte sich bei den beiden Spezies eine deutliche Zunahme der IgE-tragenden Lymphozyten. Untersuchte man neugeborene Tiere, so wurde festgestellt, daß IgE-tragende Zellen innerhalb von 24 bis 48 Stunden nach der Geburt nachzuweisen sind und nach vier Wochen diejenige Anzahl erreicht wurde, die bei adulten Tieren festgestellt worden war. Da mehr als 95 % der IgE-tragenden Zellen sowohl in neugeborenen als auch in adulten Tieren ebenfalls Oberflächen-IgM tragen, führten diese Ergebnisse zu dem Schluß, daß die IgE- und gleichzeitig IgM-tragenden Zellen von den Vorläuferstadien der IgM-tragenden B-Zellen abstammen (Ishizaka, Ishizaka, Okudaira und Bazin, 1978). Ferner wurde nachgewiesen, daß die Thymektomie neugeborener Ratten keinen Einfluß auf das Auftreten von IgE-tragenden Zellen hatte und auch thymuslose, nackte Mäuse (nu/nu) IgE-tragende Lymphozyten in ihrer Milzzellpopulation besitzen (3 % aller Zellen bzw. 5 % der B-Zellen). Dies zeigte, daß die Entwicklung von IgE-IgM-tragenden Zellen T-Zellunabhängig ist (Urban, Ishizaka und Ishizaka, 1977 a).

Die Fragestellung, ob die IgE-IgM-tragenden Zellen die Vorläuferzellen von IgE-sezernierenden Plasmazellen sind, wurde in einem in vitro System untersucht. In diesem konnten Immunglo-

bulin-sezernierende Zellen aus B-Lymphozyten generiert werden (Suemura, Urban und Ishizaka, 1978). Die durchgeführten immuno-fluoreszenzserologischen Untersuchungen dieser Immunglobulin-sezernierende Zellen zeigten, daß eine Depletion der IgE-tragenden Zellen auch zu einer deutlichen Verringerung der IgE-sezernierenden Zellen führte; die IgM- und IgG-Antwort wurde dadurch nicht beeinflußt. Eine Depletion der IgM-exprimierenden Zellen hatte andererseits auch eine merkliche Verringerung der IgE-tragenden Zellen zur Folge und es wurde gleichzeitig ein signifikanter Rückgang sowohl der IgM- als auch IgE-sezernierenden Zellen beobachtet. Es lag also die Schlußfolgerung nahe, daß die Mehrzahl der Vorläuferzellen von IgE-sezernierenden Zellen zu den IgE-IgM-tragenden Zellen gehört. Nach der Gewinnung von monoklonalem Ratten-IgD konnte gezeigt werden (Bazin et al., 1978), daß die meisten B-Lymphozyten der Ratte sowohl IgM als auch IgD tragen. Das führte zur Untersuchung der IgD-tragenden Lymphozyten in mesenterialen Lymphknoten: die Mehrzahl aller B-Zellen exprimiert sowohl μ - als auch δ -Determinanten und auch mehr als 90 % aller ϵ -tragenden Zellen, in normalen und N.b.-infizierten Ratten, tragen den δ -Isotyp (Urban, Ishizaka und Bazin, 1980). Da auch mehr als 95 % aller ϵ -tragenden Zellen über Oberflächen-IgM verfügen, erhärteten diese Untersuchungen die Vermutung, daß die Mehrheit der ϵ -tragenden Zellen sämtliche drei Isotypen (μ , δ , ϵ) exprimieren und als Vorläuferzellen der IgE-sezernierenden Zellen anzusehen sind. Die Depletion von IgD-tragenden Zellen hatte auch erwartungsgemäß zur Folge, daß die Bildung von IgE-sezernierenden Zellen in vitro deutlich abnahm, ohne daß die IgM-Antwort davon beeinflußt wurde. Darüberhinaus war es möglich, durch Injektion von anti-IgD Antikörpern in neugeborene Ratten, die IgE-Antikörperantwort zu supprimieren (Bazin, Platteau, Beckers und Pauwels, 1978).

Ebenfalls konnte auch bestätigt werden, daß die Bildung von Immunglobulin-sezernierenden Zellen T-Zellabhängig ist. Dies wurde im Rattensystem bei der IgE-Antwort von MLN-Zellen auf PWM- oder N.b.-Antigen-Einfluß untersucht. Gereinigte B-Zellen waren nicht in der Lage, nach PWM-Stimulation mit der Entwick-

Ontogeny of IgE-B-cell

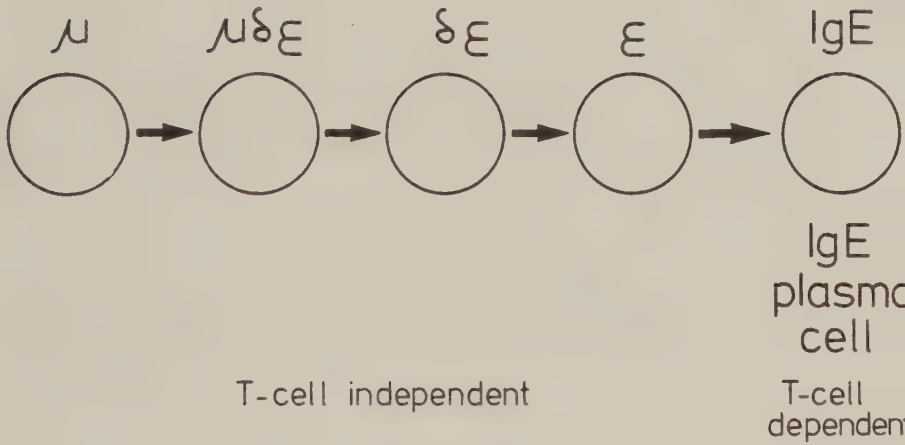


Abb. 2: Die Entwicklung von IgE-sezernierenden Zellklonen.

lung von IgE-sezernierenden Zellen zu reagieren. Kultivierte man dagegen eine konstante Anzahl von B-Zellen aus N.b.-infizierten Tieren mit T-Zellen aus N.b.-infizierten oder auch normalen Ratten und setzte diesen Zellen N.b.-Antigen zu, so entwickelten sich IgE-sezernierende Zellen ausschließlich in Gegenwart von T-Zellen der infizierten Tiere (Ishizaka, 1981).

Neuere Untersuchungen zeigten, daß 12 Tage nach Infektion von Mäusen mit N.b. 35 bis 40 % aller MLN-Zellen auf ihrer Oberfläche IgE exprimierten (Katona, Urban, Scher und Finkelman, 1982). Die Autoren konnten die Ergebnisse von Ishizaka et al. (s. o.) bestätigen und demonstrierten, daß fast alle IgM- und IgD-tragenden Lymphozyten gleichzeitig auch Oberflächen-IgE tragen. Weiterhin konnten sie in 1 % der MLN-Zellen aus N.b.-infizierten Tieren auch intrazelluläres IgE nachweisen, welches bei nicht infizierten Tieren nur in 0,1 % der Zellen gefunden werden konnte. Die beschriebenen Experimente führten in ihrer Gesamtheit zu der in Abbildung 2 gezeigten Vorstellung, daß sich ein Teil der μ -tragenden B-Zellen weiterentwickelt, in einem T-Zellunabhängigen Prozeß μ -, δ - und ϵ -Determinanten exprimiert und diese 'Tripel-Zellen' dann in einem weiteren Prozeß, der T-Zellabhängig ist, zu IgE-sezernierenden Zellen weiterdifferenzieren.

B.3. Die IgE-Antikörperantwort in vivo und in vitro

B.3.1. Die Kinetik der IgE-Antwort

B.3.1.1 .Beobachtungen im Humanmodell

Untersuchungen über den zeitlichen Verlauf der IgE-Antwort wurden schon im Jahre 1940 mit Hilfe des Prausnitz-Küstner-Tests durchgeführt (Sherman, Stull und Cooke, 1940). Diese Autoren wiesen die Persistenz der reaginen Antikörper im Serum von Patienten nach, die an Heufieber litten. Nach Etablierung der RAST-Technik (Wide, Bennich und Johansson, 1968; Kap. B.1.4.) wurde in weiteren Untersuchungen festgestellt, daß der Serumspiegel an IgE von nicht behandelten, gegen 'Ragweed' allergischen Patienten ebenfalls persistierte. Die meisten Patienten

zeigten nach der Ragweedsaison eine sekundäre, ragweedspezifische IgE-Antwort. Bedenkt man, daß die durchschnittliche Halbwertszeit des IgE bei zwei bis drei Tagen liegt (Waldmann, 1969), so ist aus der langen Persistenz der IgE-Antikörpertiter im Serum der allergischen Patienten die Folgerung zu ziehen, daß die IgE-Antikörper kontinuierlich gebildet werden. Das gleiche Bild bot sich auch bei der Untersuchung der IgG-Antwort dieser Patienten, deren Verlaufskurven für die IgE- und IgG-Antikörperproduktion Übereinstimmung zeigten (Ishizaka, 1976). Wenn man Normalpersonen Allergen ('Ragweed') injizierte, wurden von ihnen ebenfalls IgE-Antikörper gebildet, die aber nach zwei bis drei Monaten im Serum nicht mehr nachweisbar waren (Marsh, Lichtenstein und Norman, 1972).

Viele Probanden wiesen dagegen nach der Ragweedsaison erneute sekundäre IgE-Antworten auf. Wie schon erwähnt wurde (Kap. B.1.3.), gleichen sich die physikochemischen Eigenschaften wie auch biologischen Funktionen der IgE-Antikörper in den verschiedenen Spezies. Es hat sich allerdings herausgestellt, daß die Kinetik der IgE-Antikörperantwort bei verschiedenen Tierarten bzw. -stämmen Unterschiede zeigen kann. Sie kann auch abhängig sein von der Art der Immunisierung, der verwendeten Dosis und den unterschiedlichen Antigenen selber. Dieses gilt besonders auch für die Auslösung einer sekundären IgE-Antwort. Daher soll folgend ein kurzer Überblick über charakteristische Erscheinungsformen der IgE-Kinetik in Tiermodellen gegeben werden.

B.3.1.2. IgE-Produktion in der Ratte

Im Rattensystem beschrieben Mota (1964) bzw. Binaghi und Benacerraf (1964) die Bildung von IgE-Antikörpern nach Immunisierung der Tiere mit Eialbumin zusammen mit Bordetella pertussis Vakzine bzw. menschlichem IgG in Aluminiumhydroxyd als Adjuvans. Schon dort zeigte sich die auffallende Eigenschaft der IgE-Antwort, sehr kurzlebig zu sein. Einem maximalen Antikörpertiter zwischen dem 10. bis 14. Tag nach der Immunisierung folgte ein charakteristisches schnelles Verschwinden der IgE-Antikörperantwort.

Booster-Injektionen des gleichen Antigens 4 bis 5 Wochen nach Erstimmunisierung erbrachten keine Steigerung der IgE-Antwort im Gegensatz zum stetigen Anstieg der IgG-Antikörperproduktion. Mit einem anderen Immunisierungsschema gelang es Jarrett und Stewart (1974), in Hooded Lister-Ratten eine sekundäre IgE-Antwort zu induzieren. Das gelang aber mit dem gleichen System (Immunisierung mit einer bestimmten Dosis Eieralbumin oder KLH zusammen mit Bordetella pertussis Vakzine sowie einer Boosterinjektion 30 Tage später mit dem gleichen Antigen ohne Adjuvans) bei Sprague-Dawley-, Wistar- oder Lewis-Ratten allerdings nicht. Ein anderes Modell der IgE-Antikörperproduktion wurde von Tada und Okumura (1971 a) angewandt. Es basierte auf der Beobachtung, daß zwei kurz aufeinanderfolgende Injektionen von Ascaris-Extrakt einen hohen IgE-Titer in Ratten bewirkten (Strejan und Campbell, 1967). Das Besondere an Tada's und Okumura's System war der Einsatz einer sehr hohen Dosis (1 mg) von DNP-Ascaris-Extrakt, der zusammen mit Bordetella pertussis Vakzine in die Fußballen von Wistar-Ratten gespritzt wurde. Schon fünf Tage später bewirkte die intramuskuläre Gabe von 0,5 mg DNP-Ascaris-Extrakt eine IgE-Antikörperantwort gegen das homologe Antigen, die drei Tage nach der zweiten Injektion wieder abfiel. Auch in diesem Modell war es nicht möglich, durch eine Boosterinjektion mit dem gleichen Antigen, vier Wochen später durchgeführt, eine sekundäre IgE-Antwort auszulösen. Durch Röntgenbestrahlung (200 bis 400 R) einen Tag vor oder nach der Erstinjektion mit DNP-Ascaris und Bordetella pertussis gelang es, den Serum-IgE-Titer im Vergleich zu nichtbestrahlten Tieren zu erhöhen und die Persistenz der IgE-Antwort auf drei Wochen auszudehnen.

B.3.1.3. IgE-Produktion im Kaninchen

Untersuchungen im Kaninchenmodell zeigten (Zvaifler und Becker, 1966), daß die Immunisierung der Tiere mit einer hohen Dosis von DNP-Kälbergammaglobulin in Freund's Adjuvans, ebenfalls eine nur kurze Antikörperantwort bewirkte und eine Boosterinjektion keine sekundäre IgE-Antwort induzieren konnte. Bei Verwendung geringer Dosen des Antigens, zusammen mit Aluminium-

hydroxyd verabreicht, konnten dann eine primäre IgE-Produktion und - nach einer Boosterinjektion-auch sekundäre IgE-Antworten erzielt werden (Revoltella und Ovary, 1969 b). Analog wurde im Falle der Immunisierung mit DNP-Ascaris bei mehr als der Hälfte der untersuchten Tiere sekundäre anti-Hapten IgE-Antikörper erzeugt, wobei der maximale Antikörpertiter höher als der in der Erstantwort war (Ishizaka und Kishimoto, 1972).

B.3.1.4. IgE-Produktion in der Maus

Auch in der Maus wurden kurzlebige IgE-Antikörperantworten erzeugt (Mota und Peixoto, 1966; Revoltella und Ovary, 1969 a). Erst Levine und Vaz gelang es, ein Modell zu entwickeln, das dem der menschlichen IgE-Antikörperbildung von Allergikern sehr ähnlich ist, bei denen die geringe Dosis eines Allergens eine lang andauernde und saisonal unterschiedlich starke IgE-Produktion zur Folge hat. Durch Verwendung geringer Dosen (0,1 - 1 µg) verschiedener Protein-Antigene in Aluminiumhydroxyd war es möglich (Levine und Vaz, 1970), in verschiedenen Inzucht-Mäusestämmen durch intervallmäßige Immunisierungen hohe Sekundär-IgE-Antworten zu erzeugen. Die Injektion einer einzigen konzentrierten Dosis (100 µg) des gleichen Antigens induzierte dagegen lediglich eine frühe und kurzzeitige IgE-Antwort. In bestimmten Stämmen (SW-55 Mäuse) führte die Immunisierung mit 0,1 µg Eialbumin in Aluminiumhydroxyd zu einer mehrmonatigen IgE-Antikörperpersistenz, ohne daß weitere Boosterinjektionen erforderlich waren (Vaz, Vaz und Levine, 1971). Auf diesem System aufbauend, wurden verschiedene Modelle zur persistierenden IgE-Antikörperproduktion entwickelt (Okudaira und Ishizaka, 1974; Vaz, de Souza und Sauerbronn Maia, 1974; Ishizaka, Okudaira und King, 1975). Es hatte also generell den Anschein, daß die besten Bedingungen zur Erzeugung guter IgE-Antworten die Verwendung von geringen Antigendosen in Verbindung mit Aluminiumhydroxyd oder Bordetella pertussis sind. Andererseits führten hohe Antigengaben und der Gebrauch von Freund's Adjuvans - auch in Verbindung mit einer optimalen Antigendosis - nicht zu guten IgE-Antikörperantworten (Katz, 1978).

So konnten IgE-Antikörperantworten gegen Eieralbumin - durch Immunisierung mit wenigen Mikrogramm OA in Aluminiumhydroxyd - erzeugt werden, die länger als ein Jahr persistierten (Peeters und Carter, 1978). Auch zeigten die Autoren, daß 'geprimte' Milzzellen, die in sehr junge, bestrahlte Empfängertiere übertragen worden waren, dort ohne erneuten Antigenkontakt über mehrere Monate hinweg weiter IgE synthetisierten. Es hat allerdings in den letzten Jahren weitere Untersuchungen gegeben, die zeigten, daß auch auf anderen Wegen - z. B. ohne die Gabe von Adjuvans - eine IgE-Antikörperproduktion herbeizuführen ist. Die subkutane Injektion des Mitogens Concanavalin A führt zu einer spezifischen IgE-Antwort gegen ConA im Mäusemodell, auch wenn kein klassisches IgE-Adjuvans (Aluminiumhydroxyd oder Bordetella pertussis Vakzine) anwesend ist (Mitchell und Clarke, 1979). Daß die IgE-Antikörperantwort gegen bestimmte Antigene ohne Adjuvans induziert werden kann, zeigt ebenfalls die Arbeit von Taylor, Sheldon und Francis (1980): sie injizierten Balb/c-Mäusen subkutan mit einem Graspollen-Extrakt und konnten zeigen, daß eine mehrere Wochen andauernde Sekundär-IgE-Antwort auftrat, während keine Primärantwort nachzuweisen war. Daneben führte auch die Immunisierung mit DNP-Eieralbumin als Hapten-Carrier-Konjugat (nach achtmaliger, wöchentlicher Immunisierung) zu einer gut ausgeprägten anti-DNP IgE-Antwort. In einer neueren Arbeit konnte jetzt auch eine mehrere Wochen lang persistierende primäre IgE-Antwort gegen DNP-BCG (Bacillus Calmette-Guerin) induziert werden (Kato und Yamamoto, 1982). Hier führte die einmalige intraperitoneale, subkutane oder auch intravenöse Gabe einer hohen Dosis von 1 mg DNP-BCG zur Induktion von IgE-Antikörpern gegen DNP. Eine Boosterinjektion nach vier Wochen induzierte keine Steigerung der IgE-Titer und es waren keine anti-BCG IgE-Antikörper nachzuweisen. Es ist Ziel vieler Untersuchungen, im Tiermodell die Ausprägung einer menschlichen Allergie zu simulieren; daher sind Immunisierungsmethoden, die auf die Verwendung von Adjuvanzen verzichten und nur das reine Antigen zur Induzierung einer IgE-Antwort benötigen, von Bedeutung. Im Mäusemodell mit CBA-Mäusen konnte jetzt gezeigt werden, daß periodisch durchgeführte, tägliche subkutane Immuni-

sierung der Tiere mit minimalen Dosen ($\leq 0,1 \mu\text{g}$) von Penicillin, das an Kälbergammaglobulin gekuppelt war, zu einer IgE-Antikörperantwort führte. Diese verschwand erst nach sechs Wochen völlig und konnte auch geboostert werden (Hall, Ahlstedt und Kristoffersen, 1982).

Es wurde bereits erwähnt, daß den Makrophagen im Netzwerk der Zellinteraktionen bei der Antigenpräsentation große Bedeutung zukommt. So war es auch möglich, durch zweimalige Injektion von Makrophagen, die aus syngeneten Mäusen stammten, in vitro Antigenkontakt und mit dem Antigen (Eieralbumin) Komplexe gebildet hatten, eine anti-OA IgE-Antwort in B6D2F1-Mäusen zu erzeugen (Kudo, Sehon und Schwenk, 1981). Diese sekundäre IgE-Antwort persistierte über sieben Wochen hinweg und verdeutlicht die Bedeutung, welche die Antigen-präsentierenden Makrophagen auch in der IgE-Antwort haben.

B.3.2. Parasitäre Infektionen und die Produktion von IgE

Wie vorausgehend dargestellt wurde, ist das Immunglobulin E durch seine geringe Konzentration im Serum gekennzeichnet (Kap. B.1.4.) und nach einer Immunisierung besitzt die IgE-Antwort meist nur geringe Persistenz (Kap. B.3.1.). Es ist dagegen eine Besonderheit von parasitären Wurminfektionen, daß sie die Bildung spezifischer IgE-Antikörper gegen Wurmantigene und die Produktion größerer Mengen dieses Immunglobulins induzieren. Lebende parasitäre Würmer gelten als der stärkste Stimulus für die Biosynthese von IgE (Jarrett, 1973).

Schon lange bevor die Struktur und Funktion des IgE untersucht worden war, hatte man erkannt, daß parasitäre Infektionen von Mensch und Tier zu Überempfindlichkeitsreaktionen gegen parasitäre Antigene führten. So wurden schon früh Hautteste zur Diagnostik von Krankheiten wie Trichinose, Ankylostomiasis oder Schistosomiasis entwickelt (Jarrett und Urquhart, 1971; Sadun, 1972). Es war auch bekannt, daß Überempfindlichkeitsreaktionen wie Dermatitis, Asthma oder Anaphylaktischer Schock bei der Pathogenese vieler parasitärer Erkrankungen eine Rolle spielten. Beim Menschen führt die Infektion mit Wurmparasiten

- als Beispiele seien angeführt *Ascaris lumbricoides* (Johansson, Mellbin und Vahlquist, 1968), *Toxocara canis* (Hogarth-Scott, Johansson und Bennich, 1969), *Capillaria philipinensis* (Rosenberg, Whalen, Bennich und Johansson, 1971) oder *Necator americanus* (Ball und Barlett, 1969) - zu stark erhöhten Werten des Serum-IgE. Infektionen von Ratten mit dem Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis* (Ogilvie, 1964) sowie von Mäusen mit *Trichinella spiralis* (Mota, Sadun, Bradshaw und Gore, 1969) führten zur Beschreibung von reaginen Antikörpern nach Wurminfektionen im Tiermodell.

B.3.2.1. Das Modellsystem der Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis*

B.3.2.1.1. Infektionsverlauf

Bei der Infektion von Ratten mit Larven von N.b. können 3 bis 4 Wochen nach der Injektion dieses Parasiten IgE-Antikörper gegen Wurmextrakt nachgewiesen werden (Ogilvie, 1964); die Antikörper persistieren über mehrere Wochen hinweg. Nach Reinfektion der Tiere kommt es dann zur Bildung einer sekundären IgE-Antwort (Ogilvie, 1967; Wilson und Bloch, 1968). Die Infektion mit N.b. stellt eine natürliche Wirt-Parasiten-Beziehung dar. Es ist eine deutliche abgrenzbare und quantifizierbare Selbstheilung zu beobachten; der Parasit wird aus dem Wirt ausgeschieden, ohne daß eine zweite Infektion dazu erforderlich ist. Der Ausscheidungsprozeß beginnt 10 bis 11 Tage nach der Infektion und verläuft über mehrere Tage (Jarrett, Jarrett und Urquhart, 1968). Natürlicherweise durchdringen N.b.-Larven des 3. Larvenstadiums die Haut von Ratten und wandern innerhalb von 15 bis 30 Stunden in die Lungen ein (Abb. 3). Dort häuten sie sich zum 4. Larvenstadium und gelangen weitere 12 bis 30 Stunden später zum Darm, wo sie sich - nach Häutung - zu adulten Würmern entwickeln. Zwischen dem 6. bis 12. Tag nach Infektion beginnt die Eiproduktion. Die Ausbildung der Immunität durch den Wirt bewirkt ein Ausscheiden der adulten Parasiten sowie der Eier. In den Faeces des Wirtes verläuft dann die Entwicklung bis zum 3. Larvenstadium ab, welches zur Infektion neuer Wirtstiere befähigt

NIPPOSTRONGYLUS BRASILIENSIS IN THE RAT

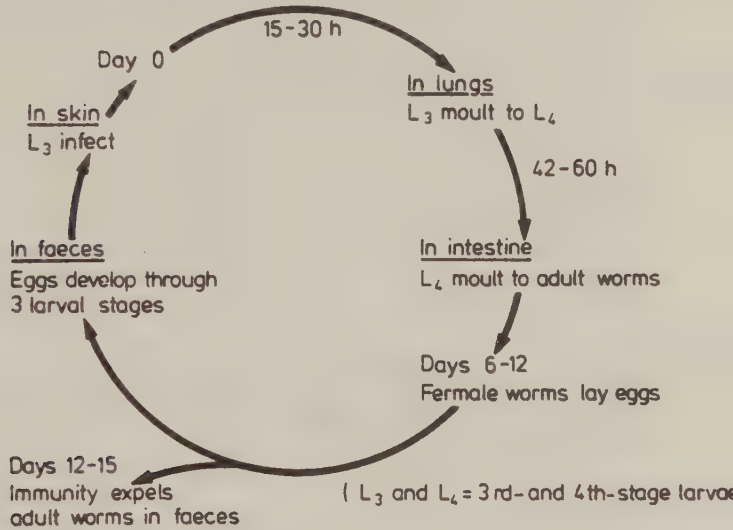


Abb. 3: Der Infektionskreislauf von *Nippostrongylus brasiliensis* in der Ratte (nach Ogilvie und Jones, 1973).

ist (Ogilvie und Jones, 1973). Untersuchungen des Infektionsverlaufes von N.b. in zwei verschiedenen Mäusestämmen zeigten, daß sich die Entwicklung der Larven in den Mäusen einen Tag langsamer als im Rattenmodell vollzog. Es reiften weniger Würmer aus und die Mäuse erreichten schneller eine aktive Immunität gegen N.b., d. h. die Würmer wurden schneller ausgeschieden, als es bei Ratten der Fall war (Ogilvie, 1971). Die Beteiligung von T-Zellen an den zu den Ausscheidungsprozessen notwendigen Reaktionsschritten wurde durch Untersuchungen mit thymuslosen Mäusen demonstriert. Solche Tiere sind nicht fähig, während ihres Lebens den Parasiten auszuscheiden (Jacobsen und Reed, 1974). Sie eliminieren die Würmer aber ebenfalls innerhalb von 14 Tagen, wenn ihnen T-Zellen gleichzeitig oder einige Tage nach der Infektion mit Larven injiziert werden (Mitchell, Hogarth-Scott, Edwards und Moore, 1976).

B.3.2.1.2. Die IgE-Kinetik in der Infektion

Mit der Entdeckung von Ratten-Myelom-IgE (Bazin, Querinjean, Beckers, Heremans und Dessy, 1974) war es möglich, die Produktion von IgE im Serum parasitär infizierter Tiere exakt zu quantifizieren. So konnte im Rattensystem ein Anstieg des totalen IgE von 0,35 µg/ml auf 250 µg/ml am 12. Tag nach N.b.-Infektion festgestellt werden (Jarrett und Bazin, 1974). Allerdings zeigte sich ein Unterschied zwischen verschiedenen Rattenstämmen. Bei Wistar-Ratten - im Gegensatz zu den oben aufgeführten Hooded Lister-Tieren - stieg die IgE-Konzentration nach N.b.-Infektion nur auf 25 µg/ml. Die Eigenschaft einer starken IgE-Produktion der Hooded Lister-Ratten zeigte sich ebenfalls bei der Immunisierung dieser Tiere mit konventionellem Antigen und erwies sich dabei auch in der Sekundärantwort als gültig (Jarrett und Stewart, 1974). Die Steigerung der IgE-Konzentration im Serum von weniger als 1 µg/ml auf 100 bis 300 µg/ml nach Reinfektion mit N.b. wurde auch bei Sprague-Dawley-Ratten gezeigt (Ishizaka, König, Kurata, Mauser und Ishizaka, 1975). Studien über die Kinetik der IgE-Bildung im Verlauf der Infektion mit N.b. bei Ratten zeigten, daß das totale IgE von 1 µg/ml (6. Tag nach Infektion) auf 250 µg/ml am 12. Tag anstieg und danach wieder ab-

fiel bis auf 25 $\mu\text{g/ml}$ am 80. Tag nach Infektion (Jarrett, Haig und Bazin, 1976). Spezifische IgE-Antikörper gegen N.b. erschienen an Tag 18 nach Infektion und erreichten ihren Höhepunkt am 34. Tag - gleichzeitig mit dem Abfall des totalen IgE - und somit 2 bis 3 Wochen später als die Maximalproduktion des gesamten IgE überhaupt. Nach einer Sekundärinfektion war ein Anstieg des totalen IgE innerhalb von 6 Tagen auf 380 $\mu\text{g/ml}$ zu verzeichnen, parallelverlaufend mit einem Anstieg des N.b.-spezifischen IgE. Dieses erreichte höhere Werte als in der Erstinfektion. Die Autoren zeigten in diesen Kinetikstudien, daß Wistar-Ratten sowohl in der Bildung von totalem als auch N.b.-spezifischem IgE deutlich unter den Werten von Hooded Lister-Ratten lagen. Die Untersuchung anderer Immunglobulinklassen (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2c}, IgA, IgM) im Rattenserum während des Verlaufs einer Infektion und Reinfektion mit N.b. zeigte, daß die Werte durch die parasitäre Infektion zwar mehr oder weniger gesteigert wurden, die Zunahmen aber bei weitem nicht so stark wie die des totalen Serum-IgE ausfielen. Dieses wird selektiv durch die Wurminfektion gesteigert (Jarrett und Bazin, 1977).

B.3.2.2. Die Potenzierung der IgE-Antwort durch Wurminfektionen

Eine weitere bedeutende Eigenschaft von Wurminfektionen besteht darin, daß sie nicht nur die IgE-Bildung gegen parasitäre Antigene steigern; sie sind auch in der Lage, unspezifisch die IgE-Antwort gegen nicht verwandte Antigene zu induzieren bzw. zu potenzieren. So wurde gezeigt, daß in Ratten die Produktion von IgE gegen Ovalbumin erheblich gesteigert werden konnte, wenn kurz nach der Verabreichung des Antigens in einer Bordetella pertussis Suspension die Tiere mit N.b. infiziert wurden (Orr und Blair, 1969). Das gleiche Ergebnis, Potenzierung der IgE-Antwort gegen OA, konnte durch Infektion von Ratten mit dem Trematoden Fasciola hepatica erreicht werden, wobei die IgE-Bildung durch eine nachfolgende zweite Infektion mit N.b. erneut gesteigert werden konnte (Jarrett, 1972). Die Steigerung der IgE-Antikörperproduktion gegen KLH und Hausstaub durch eine nachfolgende Infektion mit N.b. konnte ebenso demonstriert werden wie die Erkenntnis, daß der Beginn der parasitären Infektion

mit dem zeitlichen Verlauf der IgE-Antwort des Antigens abgestimmt sein muß. Weiterhin wurde durch eine N.b.-Infektion eine parallel verlaufende Potenzierung von anti-OA und anti-KLH IgE-Antikörpern erreicht (Jarrett und Stewart, 1972). Die Zunahme der Antikörperbildung gegen unverwandte Antigene aufgrund einer parasitären Infektion ist auf die IgE-Produktion beschränkt; sie gilt nicht für andere Immunglobulinklassen (Bloch, Ohman, Waitin und Cygan, 1973; Jarrett, Henderson, Riley und White, 1972). Es wurde auch nachgewiesen, daß die IgE-Antwort gegen OA sowohl durch Larven der Wanderungsphase (1. bis 3. Larvenstadium) - wenn diese an der Weiterentwicklung zu adulten Würmern durch Röntgenbestrahlung oder Behandlung mit Thiobenzol gehindert worden waren - als auch durch Implantation von adulten Würmern in den Dünndarm erreicht werden konnte (Jarrett und Stewart, 1973). Dagegen konnte die IgE-potenzierende Wirkung nicht durch in vitro sezernierte Wurmbestandteile (Jarrett und Stewart, 1973) oder auch totes Wurmantigen (Orr, Riley und Doe, 1971) bewirkt werden. Die Potenzierung einer IgE-Antwort nach N.b.-Infektion wird durch T-Zellen beeinflusst, was von Jarrett und Ferguson (1974) nachgewiesen wurde. Sie immunisierten Ratten, die sofort nach der Geburt thymektomiert worden waren, mit OA und Bordetella pertussis und infizierten sie nachfolgend mit N.b. Während viele der Ratten kein IgE gegen OA produzierten, traten doch Fälle auf, in denen eine schwache IgE-Antwort bestand. Diese konnte durch die N.b.-Infektion der Tiere jedoch nicht gesteigert werden, was darauf hindeutet, daß T-Zellen, die normalerweise vorhanden sind, für die Potenzierung der IgE-Antwort gegen OA notwendig sind.

Die selektive Art, mit der bei einer Wurminfektion unspezifisch nur die IgE-Antwort, nicht aber die anderer Immunglobulinklassen beeinflusst wird, wurde auch durch die bevorzugte Proliferation von IgE-tragenden Lymphozyten und ihre Differenzierung in IgE-bildende Zellen nach der Infektion von Ratten mit N.b. gezeigt (Ishizaka, Urban und Ishizaka, 1976). Untersuchungen an thymektomierten Ratten führten zu dem Ergebnis, daß T-Zellen für die Bildung von IgE-tragenden Lymphozyten nicht notwendig sind, denn auch in diesen thymuslosen Ratten konnten IgE-tragende

Zellen im Knochenmark gefunden werden. Da aber die IgE-Konzentration im Serum und die Zahl der IgE-bildenden Zellen in den mesenterialen Lymphknoten sehr viel niedriger als bei normalen Tieren war, wurde daraus die Schlußfolgerung gezogen, daß T-Zellen für die Differenzierung der IgE-tragenden zu IgE-sezernierenden Zellen notwendig sind (Urban, Ishizaka und Ishizaka, 1977 a). Damit werden auch die Ergebnisse von Jarrett und Ferguson (1974) erklärt, daß in thymektomierten Ratten keine unspezifische Potenzierung der IgE-Antwort nach N.b.-Infektion beobachtet werden konnte.

Im Mäusemodell konnte gezeigt werden, daß durch die parasitäre Infektion mit N.b. ein Carriereffekt erzielt wird und T-Zellen vorhanden sind, die spezifisch für das Wurmantigen sind (Kojima und Ovary, 1975 a). Nach Immunisierung von A/J- und Balb/c-Mäusen mit DNP-KLH in Aluminiumhydroxyd, der Infektion der Tiere mit N.b. drei Wochen später und der darauf folgenden Immunisierung mit DNP, gekuppelt an einen N.b.-Extrakt (DNP-N.b.), wurde eine hohe und lange persistierende IgE-Antwort gegen DNP erhalten. Diese Antikörperbildung ist auf die durch die Infektion hervorgerufene Induktion von carriergeprimten T-Zellen zurückzuführen, die mit DNP-spezifischen B-Zellen nach der DNP-N.b.-Gabe kooperieren. Weiterhin konnte von den Autoren eine Helferaktivität der Zellen von infizierten Mäusen in einem adoptiven Zelltransfersystem demonstriert werden. Diese Helferaktivität war durch eine in vitro Behandlung mit anti-Thy1 Antiserum und Komplement zu verhindern. Ebenfalls konnte die Potenzierung der Primär- und Sekundärantwort von Maus-IgE gegen DNP-OA durch N.b.-Infektion erreicht werden, wenn die Infektion (im Gegensatz zum Rattensystem) 14 oder 5 Tage vor der Immunisierung mit DNP-OA in Aluminiumhydroxyd stattfand (Kojima und Ovary, 1975 b). Dagegen wurde auch hier die anti-DNP IgG₁-Antwort nicht beeinflusst. In einem weiteren adoptiven Zelltransferexperiment wurde gezeigt, daß die erhöhte Antwort gegen DNP auch erhalten werden konnte, wenn Mäusen, die zuvor Lymphozyten von Tieren erhalten hatten, die N.b.-infiziert und DNP-'geprimt' waren, N.b. und gleichzeitig DNP-OA verabreicht wurden. Dies läßt darauf schließen, daß die N.b.-spezifischen T-

Zellen nach Stimulierung mit dem Wurmantigen ein bestimmtes Signal zur B-Zellaktivierung bzw. IgE-Sezernierung liefern.

Vergleicht man die Kinetiken des totalen Serum-IgE mit dem Verlauf der N.b.-spezifischen IgE-Antwort und der potenzierten IgE-Antwort gegen OA durch die N.b.-Infektion, werden die von Jarrett, Haig und Bazin (1976) demonstrierten Befunde erhalten. Nach der Erstinfektion ist ein Anstieg des totalen und des OA-spezifischen IgE bis zum 12. bzw. 14. Tag zu beobachten; danach sinken beide IgE-Konzentrationen wieder ab. Vom 17. Tag an erfolgt der Anstieg des N.b.-spezifischen IgE bis zum Maximum am Tag 55, danach fällt die spezifische N.b.-Antwort nur sehr langsam über viele Wochen hinweg ab. Nach einer Reinfektion mit N.b. steigt die Konzentration des totalen IgE innerhalb von 6 Tagen wieder an, was parallel dazu auch für das N.b.-spezifische IgE gilt. Dagegen kommt es nach einer Sekundärinfektion zu keinem Anstieg des OA-spezifischen IgE. Die Autoren postulierten daher, daß die totale IgE-Antwort und die potenzierte gegen OA, die einen kleinen Teil davon darstellt, auf der Bildung eines unspezifischen Faktors durch N.b.-spezifische T-Zellen beruht. Durch eine getrennte, spezifische Helferfunktion werden die gleichen oder ähnliche Zellen zur Produktion von N.b.-spezifischem IgE angeregt.

Die Infektion mit den Wurmparasiten *Ascaris lumbricoides* bzw. *Necator americanus* induziert beim Menschen hohe Titer von Serum-IgE, wobei festgestellt wurde, daß IgE-Antikörper spezifisch für das *Ascaris*-Antigen nur einen sehr geringen Prozentsatz des Gesamt-IgE ausmachen (Turner, Feddema und Quinn, 1979). Parasitäre Infektionen induzieren sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell die Produktion von sehr viel IgE, dessen Spezifität aber nicht mit dem Parasitenantigen verwandt ist. Die Spezifität des IgE konnte von den Autoren nicht geklärt werden, es wurde aber gezeigt, daß sie nicht gegen inhalierbare Allergene wie Pollen, Milben, Schimmelpilze o. ä. gerichtet war.

Auch im Meerschweinchen war der potenzierende Effekt einer Wurminfektion auf die IgE-Antwort gegen OA zu demonstrieren. Es wurde beim Vergleich verschiedener Adjuvanzen festgestellt, daß nur die Infektion mit *Ascaris suum* - gleichzeitig mit der Erst-

immunisierung - eine erhöhte IgE-Produktion gegen OA zur Folge hatte. Dagegen hatte die Gabe von CFA, IFA, LPS, *Salmonella typhosa*, *Bordetella pertussis* oder eine Infektion mit N.b. keine Wirkung auf die IgE-Antwort sondern nur auf die IgG₁-Produktion (Maretta und Casey, 1979). Während aber N.b. im Meer-schweinchen zu keiner Entwicklung fähig ist, findet eine Weiterentwicklung der infektiösen Eier von *Ascaris* zu Larven des 3. Larvenstadiums statt, was die unterschiedliche Wirkung beider Parasiteninfektionen auf die Induktion der potenzierten anti-OA IgE-Antwort erklären kann. Versuche, die IgE-Antwort gegen OA im Ratten- bzw. Mäusemodell mit *Ascaris suum* zu erhöhen, konnten nicht erfolgreich durchgeführt werden (Bradbury, Percey und Strejan, 1974; Crandall, 1976). Wie schon erwähnt, war es nicht möglich, die IgE-Antwort gegen OA durch Immunisierung mit toten N.b.-Würmern (homogenisiert und sonikiert) oder auch in vitro gewonnenen Sekretionsprodukten dieses Nematoden zu erhöhen (Orr, Riley und Doe, 1971; Jarrett und Stewart, 1973). Im Meer-schweinchen-system gelang es nun, die IgE-Antwort gegen OA durch Immunisierung mit einem löslichen Antigen, gewonnen aus dem Kulturüberstand von Larven des Parasiten *Ascaris suum*, zu steigern. Das deutet darauf hin, daß die Verwendung von bestimmten Parasitenprodukten in geeigneter Konzentration ebenso die Potenzierung der IgE-Antwort gegen andere Antigene unspezifisch erhöhen kann, ohne daß eine Infektion mit lebenden Parasiten dafür notwendig ist (Stromberg, 1980). Dieses Ergebnis wird bestätigt durch Experimente mit *Schistosoma mansoni* in Ratten (Rousseaux-Prévost, Dessaint und Capron, 1982). Diese Untersuchungen zeigten, daß die Infektion der Tiere mit Cercarien des Parasiten die IgE-Antwort gegen OA erhöhte, wenn die Infektion 14 Tage nach der Immunisierung erfolgte. Weiterhin war es möglich, mit einem löslichen Faktor aus Kulturen von adulten *Schistosoma*-Parasiten die IgE-Antwort gegen OA zu erhöhen. Dazu mußte vorher die immunsuppressive Eigenschaft dieses Faktors (Dessaint, Camus, Fischer und Capron, 1977) durch Dialyse entfernt werden. Über Versuche, die IgE-Produktion regulativ zu beeinflussen und die Erzeugung verschiedener löslicher Faktoren, die dabei eine Rolle spielen, wird im nachfolgenden Kapitel berichtet.

B.3.3. Regulationsmechanismen der IgE-Antwort

B.3.3.1. Mechanismen zur Suppression und Steigerung der IgE-Antwort

Wie in Kapitel B.2.2. (S. 10) dargelegt wurde, sind T-Lymphozyten zur Bildung der IgE-Antikörperantwort notwendig und es existiert ein Zusammenspiel zwischen carrier- und haptenspezifischen Zellen bei der IgE-Produktion. Dabei bilden T-Lymphozyten die carrierspezifischen Helferzellen. Es ergab sich daraus die Fragestellung, welche Mechanismen für eine Limitierung der kurzen IgE-Antwort z. B. in Ratten verantwortlich sind oder in bestimmten Mäusestämmen das Erscheinen der IgE-Produktion verhindern oder minimieren. Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, daß Eingriffe in das Immunsystem - wie die Ganzkörperbestrahlung von Tieren (Tada, Taniguchi und Okumura, 1971), die Thymektomie oder Splenektomie adulter Tiere (Okumura und Tada, 1971 a) oder die Verabreichung von Immunsuppressiva (Taniguchi und Tada, 1971) - ermöglichten, die kurze und geringe IgE-Antwort von Ratten in eine länger anhaltende und größere Produktion von IgE umzuwandeln. Eine solche erhöhte IgE-Antwort in Ratten konnte aufgehoben werden, wenn den Tieren syngene T-Lymphozyten oder Milzzellen übertragen wurden (Okumura und Tada, 1971 b). So kam man zu der Schlußfolgerung, daß die normalerweise bestehende, geringe und kurzzeitige IgE-Antwort einem kontrollierenden Regulationsmechanismus von T-Suppressorzellen unterliegt. Diese Regulation kann nach Ausschaltung dieser Zell-Suppopulation durch die o. g. Manipulationen nicht mehr erfolgen; es kommt daher zu einer erhöhten IgE-Antwort. Wie im Rattensystem, so konnte auch bei Untersuchungen im Mäusemodell gezeigt werden, daß verschiedene Eingriffe (Bestrahlung, Behandlung mit Cyclophosphamid, Thymektomy oder Gabe von anti-Lymphozytenserum) selektiv den Umfang der IgE-Antwort in Mäusen erhöhen konnten (Chiorazzi, Fox und Katz, 1976; Chiorazzi, Fox und Katz, 1977; Chiorazzi, Tung, Eshhar und Katz, 1977; Watanabe, Kojima und Ovary, 1976; Watanabe, Kojima, Shen und Ovary, 1977). Aus diesen Untersuchungen leitet sich die Hypothese ab, daß die Regulation der IgE-Antikörpersynthese einem Suppressions- oder

Dämpfungsmechanismus unterliegt, der im Normalfall die IgE-Produktion nach der Sensibilisierung mit einem Antigen limitiert. Wenn unter bestimmten Umständen dieser Mechanismus gestört ist, kommt es dann dagegen zur erhöhten Produktion von IgE-Antikörpern (Katz, 1980).

B.3.3.2. IgE-spezifische lösliche Faktoren

Die IgE-Antwort unterliegt nicht nur der Regulation bestimmter Zellpopulationen und dem Zusammenwirken zellulärer Komponenten. Sie kann auch durch lösliche Faktoren, die von Zellen unter bestimmten Voraussetzungen produziert und freigesetzt werden oder auch im Serum vorhanden sind, beeinflusst werden. Im folgenden soll eine Übersicht über die in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnisse gegeben werden.

B.3.3.2.1. Lösliche Faktoren von Kaninchenzellen

Die ersten Studien über den Einfluß von löslichen T-Zellfaktoren auf die IgE-Synthese wurden im Kaninchensystem durchgeführt. Es wurde ein Modell mit Kaninchenlymphozyten etabliert, in dem es möglich war, die in vitro IgE-Antwort gegen DNP zu erfassen (Ishizaka und Kishimoto, 1972, 1973 a, 1973 b). Unter den geschaffenen Bedingungen konnten lösliche T-Zellfraktionen produziert werden, die in der Lage waren, die IgE-oder auch IgG-Antikörperproduktion der kultivierten Zellen gegen DNP zu regulieren (Kishimoto und Ishizaka, 1973 c, 1974). Es zeigte sich, daß beide Faktoren voneinander verschieden waren und ihre Selektivität für die IgE-oder IgG-Antwort darauf beruhte, von welchen Zellpopulationen sie gebildet wurden. Dieses war von der Art der Immunisierung abhängig; beide Faktoren unterschieden sich auch in ihrem Molekulargewicht (Kishimoto und Ishizaka, 1975).

B.3.3.2.2. Lösliche Faktoren von normalen Mäusemilzzellen

Es hatte sich gezeigt, daß SJL-Mäuse sogenannte Lowresponder bezüglich der IgE-Antwort sind. Die IgE-Produktion der Tiere konnte durch Infektion mit N.b. und Röntgenbestrahlung erhöht werden, so daß die Mäuse eine hohe und persistierende hapten-spe-

zifische IgE-Antwort aufwiesen (Watanabe, Kojima und Ovary, 1976; Watanabe, Kojima, Shen und Ovary, 1977). Wie schon in Kap. B.3.2.1. (S. 22) dargelegt, konnten diese erhöhten IgE-Antworten auch hier durch den Transfer normaler SJL-Milzzellen wieder supprimiert und beendet werden. Es war weiterhin möglich, durch mehrmaliges Gefrieren und Auftauen von Milzzellsuspensionen, einen löslichen Faktor zu erhalten, der die erhöhte IgE-Antwort von SJL-Mäusen inhibierte (Watanabe und Ovary, 1977). Dieser Faktor war charakterisiert durch seine IgE-Spezifität, Hitzelabilität (56° C) und Spaltbarkeit durch proteolytische Enzyme. Weiterhin war sein Molekulargewicht größer als 300 000 dalton, er reagierte nicht mit anti-Maus Immunglobulinantikörpern und hatte keine Antigenspezifität.

B.3.3.2.3. Lösliche Faktoren von Antigen-sensibilisierten Mäusemilzzellen

Ein anderes System konnte entwickelt werden, in dem die Gabe von DNP-Tbc (an DNP gekuppelte Mykobakterien) T-Suppressorzellen induzierte, die auf DNP reagierten und selektiv die IgE-Antwort suppressiv beeinflussten (Kishimoto, Hirai, Suemura und Yamamura, 1976). Die Suppression der IgE-Antwort wurde dabei in vitro induziert, wenn solche intakten Suppressorzellen in die Kultur gebracht wurden. Auch wenn lösliche Faktoren, die von solchen Suppressorzellen freigesetzt worden waren, zu kultivierten Zellen hinzugefügt wurden, kam es zur Inhibition der IgE-Antwort (Suemura, Kishimoto, Hirai und Yamamura, 1977). Dieser Faktor wurde ebenfalls näher charakterisiert und die Voraussetzungen, die zu seiner Bildung führen, geklärt. Notwendige Bedingung für die Induktion des suppressiven Faktors war die DNP-spezifische Stimulation der DNP-reaktiven T-Zellen. Obwohl diese antigenspezifische Stimulierung benötigt wurde, ist die Aktivität des Faktors völlig antigenunspezifisch, d.h. er supprimiert selektiv die IgE-Bildung und wirkt auf die IgE B-Zellen. Die suppressive Aktivität kann nur entwickelt werden, wenn der Faktor und die Zielzelle genetisch (MHC) übereinstimmen. Es zeigte sich weiterhin, daß der Faktor Determinanten trägt, die von Genen der I-Region des H-2-Komplexes kodiert

werden. Das Molekulargewicht dieses Suppressorfaktors liegt zwischen 55 000 und 60 000 dalton (Kishimoto, Hirai, Suemura, Nakamishi und Yamamura, 1978). Durch die Etablierung einer T-Zell-Hybridomlinie, die kontinuierlich diesen Suppressorfaktor produziert, wurde nachgewiesen, daß der Faktor von T-Lymphozyten gebildet wird (Watanabe, Kimoto, Maruyama, Kishimoto und Yamamura, 1978).

B.3.3.2.4. Lösliche Faktoren von Lymphozyten aus N.b.-infizierten Ratten

Im Modell der Infektion von Mäusen mit N.b. wurde nachgewiesen, daß Lymphozyten von infizierten Mäusen nach Antigenstimulation in vitro mit N.b.-Extrakt einen löslichen Faktor produzierten, der selektiv die IgE-Antwort erhöhte, wenn er in andere Mäuse übertragen wurde (Kojima, Kamijo und Ovary, 1980). Der Faktor wurde noch nicht weiter charakterisiert, aber die Autoren konnten zeigen, daß dieser Faktor seinen Effekt auf T-Helferzellen ausübt, die dann ein Signal für die IgE-Zellen liefern.

Es wurde schon früher gezeigt, daß nach Infektion von Ratten mit N.b. die Zahl von IgE-tragenden Lymphozyten in Milz und mesenterialen Lymphknoten ansteigt (Ishizaka, Urban und Ishizaka, 1976). Das gilt auch für kurz nach der Geburt thymektomierte Ratten, diese weisen aber keinen für die N.b.-Infektion typischen Anstieg von Serum-IgE auf (Urban, Ishizaka und Ishizaka, 1977 a). Im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen wurde dann ein Faktor charakterisiert (Urban, Ishizaka und Ishizaka, 1977 b), der die Entwicklung von IgE-tragenden Lymphozyten in Kulturen von normalen MLN- oder Knochenmarkzellen stimuliert. Dieser 'IgE B cell generating factor' wurde in den Kulturüberständen von N.b.-infizierten Ratten gefunden; er hat ein Molekulargewicht von 10 000 bis 20 000 dalton und induziert selektiv die Bildung von IgE-tragenden Lymphozyten. Seine Aktivität blieb unberührt von der gleichzeitigen Sekretion von IgE in den Kulturüberständen der Zellen aus infizierten Ratten. Er zeigte auch Sensitivität auf Trypsin- und Ribonuklease A-Aktivität, was darauf hindeutet, daß der Faktor RNA und Polypeptide enthält. Der 'IgE B cell generating factor' wird von IgE-tragenden

B-Zellen sezerniert (Urban, Ishizaka und Ishizaka, 1978) und übt einen Einfluß auf unreife B-Lymphozyten aus, die IgM exprimieren. Unter seiner Wirkung differenzieren diese Zellen weiter zu IgM- plus IgE-tragenden Lymphozyten. Die Hauptquelle zur Bildung des Faktors bilden Lymphozyten von N.b.-infizierten Ratten, die auf ihrer Oberfläche gleichzeitig IgM, IgD und IgE tragen (Urban, Ishizaka und Bazin, 1980). Die Untersuchungen zeigten weiterhin, daß Bridging von entweder IgE- oder auch IgD-Molekülen durch anti-IgE bzw. anti-IgD eine erhöhte Produktion des Faktors durch die Zellen bewirkte. Dagegen führte Cross-linking durch anti-IgM Antikörper nicht zu diesen Effekt. Wurden die Zellen dagegen mit anti-IgM Antikörpern vorbehandelt, konnte die Wirkung von anti-IgE bzw. anti-IgD Antikörpern zur Erhöhung der Faktorproduktion verhindert werden.

Ein weiterer Faktor, der charakterisiert werden konnte, ist der 'IgE-potentiating factor'. Dieser Faktor stimuliert die Entwicklung von IgE-haltigen Plasmazellen in Kulturen von MLN-Zellen aus DNP-OA 'geprimten' Ratten, deren IgE-Antwort gegen das homologe Antigen (DNP-OA) untersucht wurde (Suemura und Ishizaka, 1979). Der Faktor ist ebenfalls selektiv für Immunglobulin E und zeigt keinen Einfluß auf die Entwicklung von IgG-haltigen Zellen.

In weiteren Untersuchungen erwies sich, daß der Faktor von Lymphozyten N.b.-infizierter Ratten, die Rezeptoren für IgE tragen ($Fc\epsilon R^+$), gebildet wird. Er bindet an Oberflächen-IgE von Vorläufern der IgE-sezernierenden Zellen und verstärkt deren Differenzierung (Suemura, Yodoi, Hirashima und Ishizaka, 1980). Das Molekulargewicht liegt zwischen 10 000 und 20 000 dalton und der Faktor hat eine Affinität für Linsenlektin.

Im Gegensatz zum beschriebenen 'IgE potentiating factor', der von Lymphozyten gebildet wird, die am 14. Tag nach N.b.-Infektion kultiviert werden, konnte ein weiterer Faktor gefunden werden; und zwar dann, wenn Lymphozyten am 8. Tag nach N.b.-Infektion unter Zusatz von 10 µg/ml Ratten-IgE kultiviert wurden (Yodoi und Ishizaka, 1980). Kulturüberstände dieser Zellen enthielten wiederum einen IgE-bindenden Faktor, der

allerdings eine entgegengerichtete biologische Aktivität besitzt: er bewirkt nämlich die Suppression der durch den Potenzierungsfaktor erhöhten IgE-Antwort (Hirashima, Yodoi und Ishizaka, 1980). Dieser 'IgE-suppressing factor' ist mit dem 'IgE-potentiating factor' vergleichbar und besitzt ebenfalls Affinität für IgE und ein Molekulargewicht von 10 000 bis 20 000 dalton. Beide Faktoren unterscheiden sich hauptsächlich durch ihren Kohlenhydratanteil. Während der Potenzierungsfaktor an Linsenlektin bindet, konnte das für den suppressiven Faktor ebensowenig wie die Bindung an ConA-Sepharose demonstriert werden (Yodoi, Ishizaka und Ishizaka, 1979; Yodoi, Hirashima und Ishizaka, 1980). Es wurde auch nachgewiesen, daß die Bildung dieser IgE-bindenden Faktoren nicht an parasitäre Infektionen gebunden ist. Auch Lymphozyten aus mit CFA behandelten Ratten produzieren beide Faktoren, wobei sich die Aktivität des suppressiven Faktors größer als die des 'potentiating' Faktors erwies (Ishizaka, Suemura, Yodoi und Hirashima, 1981). Beide Faktoren wurden ebenfalls im Serum von CFA behandelten Tieren nachgewiesen, was darauf hindeutet, daß diese Faktoren in vivo gebildet werden.

Da die IgE-bindenden Faktoren aus MLN-Zellen von N.b.-infizierten Ratten gewonnen worden waren, lag die Vermutung nahe, daß aktivierte T-Zellen in Gegenwart von IgE mit der Bildung dieser Faktoren antworten. Es wurden daher weitere Untersuchungen zur Beziehung der beiden IgE-bindenden Faktoren (EPF = IgE-potentiating factor, ESF = IgE-suppressive factor) durchgeführt (Ishizaka, Yodoi, Hirashima und Hirata, 1981). Es zeigte sich, daß die Aktivierung von T-Zellen mit 10 µg/ml Concanavalin A danach in Gegenwart von IgE zur Bildung des EPF führte. Dagegen produzierten T-Zellen, die mit 1 µg/ml ConA aktiviert worden waren, den suppressiven Faktor (ESF). Wenn man die mit 10 µg ConA aktivierten T-Zellen allerdings mit Tunicamycin oder auch - vor IgE-Inkubation - mit Dexamethason zusammen kultivierte, so bildeten diese Zellen ebenfalls den ESF. Andererseits war es möglich, die mit 1 µg aktivierten Zellen durch Inkubation mit Melittin (einem Phospholipase A₂-Aktivator) zur Bildung von ESF anzuregen.

Wie schon erwähnt wurde, produzieren Lymphozyten von Ratten, die mit CFA immunisiert wurden, ebenfalls ESF. Diese Zellen konnten durch Inkubation mit Melittin ebenfalls zur Bildung von EPF angeregt werden. Die Ergebnisse deuten in der Gesamtheit darauf hin, daß die gleichen T-Zellen sowohl EPF als auch ESF bilden können und im Prozeß der Glykolysation von gemeinsamen Vorläufermolekülen über die Art eines IgE-bindenden Faktors (EPF oder ESF) entschieden wird (Ishizaka, Yodoi, Hirshima und Hirata, 1981).

In einem weiteren Versuch wurden die mit 1 µg ConA aktivierten T-Zellen mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen ein Inhibitorprotein von Phospholipase A₂ gerichtet ist, inkubiert. Auch dort kam es zur Bildung von ESF durch die T-Lymphozyten (Yodoi, Hirashima, Hirata, DeBlas und Ishizaka, 1981).

Weitere Untersuchungen wiesen dann einen Faktor nach - gebildet von T-Zellen aus mit CFA immunisierten Ratten -, der die Glykolysation der IgE-bindenden Faktoren während ihrer Biosynthese inhibiert (Hirashima, Yodoi, Huff und Ishizaka, 1982). Die Charakterisierung dieses Faktors ergab ein Molekulargewicht von 16 000 dalton sowie keine Affinität für ConA und Peanut-Agglutinin. Dieser Faktor bindet aber spezifisch an einen monoklonalen Antikörper gegen Lipomodulin, ein Phospholipase-Inhibitorprotein (Uede, Hirata, Hirashima und Ishizaka, 1982). Auch gereinigtes Lipomodulin inhibierte die Glykolysation der IgE-bindenden Faktoren und die Untersuchungen dieser Autoren deuten darauf hin, daß der die Glykolysation inhibierende Faktor ein Teilstück von phosphoryliertem Lipomodulin ist.

Es wurde mittlerweile auch möglich, zwei T-Zell-Hybridome zu erzeugen, die IgE-bindende Faktoren produzieren (Huff und Ishizaka, 1982). Während ein Zellklon einen Faktor mit einem Molekulargewicht von 26 000 dalton bildet, werden von einem weiteren Klon IgE-bindende Faktoren mit Molekulargewichten von 26 000 und 13 000 dalton sezerniert. Beide Faktoren binden nicht an Linsenlektin, haben aber Affinität für Peanut-Agglutinin. Es konnte gezeigt werden, daß der gereinigte Faktor (13 000 dalton) die IgE-Antwort (Produktion von IgE-bildenden Zellen) inhibiert.

Der zweite Faktor (26 000 dalton) zeigte jedoch weder einen supprimierenden noch einen steigernden Einfluß. Die Struktur und Wirkung der IgE-bindenden Faktoren wurden bisher ausschließlich in vitro durchgeführt; Nachweise für eine regulative Rolle dieser Faktoren in vivo stehen noch aus.

B.3.3.2.5. Lösliche Faktoren aus Serum und Aszites von Mäusen

Es wurden noch zwei weitere regulativ wirkende Faktoren - selektiv für IgE - beschrieben. Sie üben supprimierende oder verstärkende Einflüsse auf die IgE-Antwort in Mäusen aus und werden als 'suppressiv factor of allergy' (SFA) und 'enhancing factor of allergy' (EFA) bezeichnet (Katz, 1978). Die Aktivität des SFA wurde zuerst im Serum von SJL-Mäusen entdeckt, die mit CFA (complete Freund's Adjuvans) immunisiert worden waren (Tung, Chiorazzi und Katz, 1978; Katz und Tung, 1978). Wenn ein CFA-Serum in andere SJL-Mäuse übertragen wurde, deren geringe IgE-Antwort durch Bestrahlung in eine hohe Antikörperproduktion umgewandelt worden war, suppressierte das übertragene Serum diese erhöhte IgE-Antwort wieder auf das normale Maß oder noch darunter. Wie die Autoren zeigten, konnte diese SFA-Aktivität sowohl bei der erhöhten primären IgE-Antwort (Tung, Chiorazzi und Katz, 1978) als auch in adoptiven Sekundärantworten nach einem Transfer 'geprimter' Milzzellen in bestrahlte Lowresponder-Tiere festgestellt werden (Katz und Tung, 1978). Der SFA erscheint in IgE-Lowresponder Mäusen in sehr viel größeren Konzentrationen als in IgE-Highresponder Mäusen. Er ist in normalem Mäuseserum vorhanden, seine Konzentration wird aber erheblich durch Immunisierung mit CFA gesteigert. Weiterhin wird der SFA auch in Aszitesflüssigkeit, die in Mäusen durch mehrmalige CFA-Immunisierung erzeugt wurde, induziert (Tung, Chiorazzi und Katz, 1978; Katz und Tung, 1978). Der SFA ist sehr selektiv für IgE-Antworten und wirkt nicht antigenspezifisch. Es wurde auch gezeigt, daß der SFA über Stamm- und Speziesunterschiede hinweg wirkt, unabhängig davon, ob das mit SFA behandelte Individuum zum Low- oder Highresponder IgE-Typ gehört (Katz, Bargatze, Bogowitz und Katz, 1980). Die weitere Charakterisierung zeigte, daß der SFA hitzestabil (56° C), kein Lipo-

protein und mit Ammoniumsulfat präzipitierbar ist, sowie ein Molekulargewicht zwischen 150 000 und 200 000 dalton besitzt. Weiterhin exprimiert er keine Immunglobulin- oder MHC-Determinanten, aber solche, die auch auf β_2 -Mikromolekülen gefunden wurden (Katz und Tung, 1979). Der im Serum bzw. Aszites von mit CFA 'geprimten' Mäusen beschriebene EFA unterscheidet sich von dem SFA durch seine Wirkung (Steigerung der IgE-Antikörperproduktion), seiner hohen Affinität für Concanavalin A und Hydrophobie. Weiterhin beginnt die Produktion von EFA nach Immunisierung mit CFA schon sehr früh und erreicht ihren Höhepunkt nach 3 bis 4 Tagen, während die Produktion von SFA ihr Maximum am 7. bis 10. Tag erreicht (Katz, Bargatze, Bogowitz und Katz, 1979).

In weiteren Untersuchungen wurde auch gezeigt, daß die Induktion von Mauslymphozyten möglich ist, die Fc-Rezeptoren für IgE auf der Oberfläche tragen. Durch Gabe von SFA konnte das selektiv supprimiert werden. Dagegen wurde die Bildung von Lymphozyten, die Fc-Rezeptoren für IgG_{2b} tragen, durch den SFA nicht beeinflusst (Chen, Bohn, Liu und Katz, 1981).

Es konnte auch ein dem SFA analoger Faktor nachgewiesen werden, der von menschlichen Mononucleären Zellen in vitro produziert wird und in der Lage ist, selektiv die IgE-Produktion (aber nicht die von IgG) der kultivierten Zellen zu verringern (Zuraw, Nonaka, O'Hair und Katz, 1981).

B.3.3.3. Lymphokine in der Immunantwort

In Kapitel B.3.3.2. wurden lösliche Faktoren beschrieben, die spezifisch an der IgE-Antikörperantwort beteiligt sind. In den letzten Jahren wurde erwiesen, daß die Mitogen- oder Antigen-induzierte Aktivierung von Lymphozyten nicht allein durch zelluläre Interaktionen oder durch die Präsentation des Antigens ausgelöst wird. Vielmehr sind daran eine Reihe von Faktoren beteiligt, sogenannte Lymphokine, die Signale zur Zellproliferation und -differenzierung vermitteln. Daher soll abschließend - nachdem bisher die IgE-spezifischen Regulationsmechanismen dargestellt worden sind - die heutigen Vorstellungen über das Zusammen-

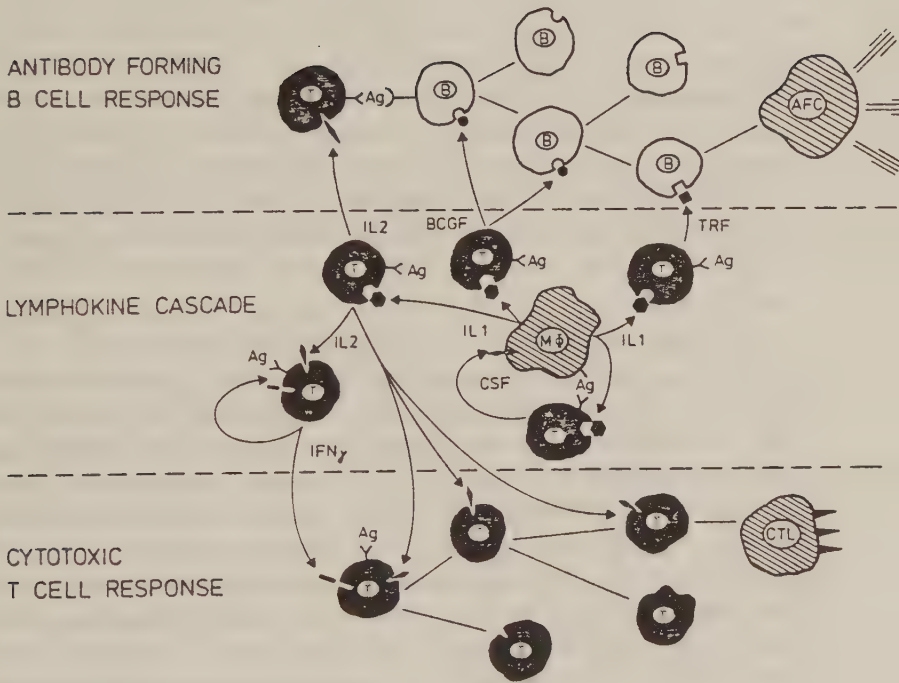


Abb. 4: Die Lymphokinkaskade in der Immunantwort
 AFC = Antikörper-bildende B-Zellen;
 Ag. = Antigen; B = B-Lymphozyt;
 BCGF = B cell growth factor;
 CSF = colony stimulating factor;
 CTL = Zytotoxische T-Zelle;
 IL1, IL2 = Interleukin 1, 2;
 M Φ = Makrophage; T = T-Lymphozyt;
 TRF = T cell replacing factor;
 (aus: Farrar et al., 1982).

menwirken von antigenunspezifischen Helferfaktoren und verschiedenen Zellen dargelegt werden.

Die Abbildung 4 (S. 39) zeigt diese Interaktionen zwischen verschiedenen Faktoren und Zellen in einem Diagramm (Farrar, Benjamin, Hilfiker, Howard, Farrar und Fuller-Farrar, 1982). In diesem Bild wird die Rolle der Lymphokin-Kaskade bei der Verstärkung der antigenspezifischen T- und B-Zellantwort verdeutlicht. Verschiedene Faktoren sind dabei von Bedeutung. So das Interleukin 1 (IL 1), welches von aktivierten Makrophagen freigesetzt wird. Wie aus der Abbildung hervorgeht, besteht eine Interaktion zwischen T-Zellen und Makrophagen.

Von T-Zellen wird der sogenannte 'colony stimulating factor' (CSF) produziert, der die Makrophagen aktivieren kann. Der CSF erhöht auch die IL 1-Produktion; dies kann zu einer weiteren Verstärkung der CSF-Bildung führen. Andererseits liefert das IL 1 den Antigen-stimulierten T-Helferzellen ein zweites Signal zur Bildung von anderen, die Immunantwort steigernden, Lymphokinen. Dazu gehören Interleukin 2 (IL 2), der 'B cell growth factor' (BCGF) sowie der 'T cell replacing factor' (TRF). IL 2 unterstützt die Thymozytenproliferation und verstärkt die Generierung von zytotoxischen T-Zellen sowie T-Suppressorzellen. Bei diesem Prozeß wird durch IL 2 auch die Bildung von Immun-Interferon (IFN γ) angeregt. Dieses wird nach dem IL 2-Signal von Antigen-stimulierten T-Zellen (Lyt 2⁺) produziert und beeinflusst die zytotoxische T-Zellantwort.

Darüberhinaus kann IL 2 zur Vermehrung von antigenspezifischen T-Zellen beitragen. Der ebenfalls von T-Lymphozyten freigesetzte BCGF wirkt für stimulierte (Antigen, Mitogen) B-Zellpopulationen als Signal zur Proliferation. Dagegen wird von dem TRF ein terminales Signal für diese Antigen- oder Mitogen-stimulierten und proliferierenden B-Zellen geliefert, in Antikörper-sezernierende Zellen weiterzudifferenzieren.

IL 2, TRF und CSF werden von Lyt1⁺2⁻3⁻ T-Zellen produziert, die Oberflächencharakteristika derjenigen Zellen, die BCGF bilden, sind noch nicht bekannt. Man nimmt an, daß die in Abbildung 4 dargestellten Lymphokine als diejenigen Faktoren anzusehen sind,

die für die Aktivierung, Aufrechterhaltung und Steigerung der zytotoxischen T-Zellantwort (unterer Abbildungsteil) sowie der Antikörper-bildenden B-Zellantwort (oberer Bildteil) verantwortlich sind.

Lymphokine werden in vitro getestet und untersucht. Durch ihre beschriebene Wirkung auf T-Helferzellen bzw. ihren Einfluß auf B-Lymphozyten (BCGF, TRF) greifen sie in die Regulation der Immunantwort ein. Inwieweit sie allerdings spezifisch die IgE-Antikörperbildung beeinflussen und welche Vorgänge in vivo von ihnen kontrolliert werden, konnte bisher noch nicht geklärt werden.

B.4. Die genetische Regulation der IgE-Antwort

Immunantworten, die IgE-Antikörperantworten eingeschlossen, sind eine komplexe Folge von Vorgängen, die nacheinander und auf vielfältige Art miteinander verknüpft ablaufen. Der erste Schritt wird dabei durch das Erkennen der antigenen Determinanten durch spezifische Rezeptormoleküle, die auf der Oberfläche von Lymphozyten getragen werden, ausgeführt. Die spezifische Antigenerkennung induziert die Proliferation derjenigen Zellen, die die passenden Rezeptoren tragen und führt schließlich auch zur Synthese von Antikörpern. In diesem Netzwerk von ineinandergreifenden Abläufen gibt es viele Stellen, an denen auch eine genetische Kontrolle eingreifen kann bzw. eingeschaltet ist; sei es bei der Antigenerkennung durch Lymphozyten, der Interaktion von T- und B-Zellen oder der Kontrolle der Antikörperbildung, speziell der IgE-Produktion. Mit der Entdeckung des IgE als Träger der allergischen Reaktion wuchs daher auch die Bedeutung einer genetischen Regulation seiner Bildung. Im folgenden soll eine kurze Übersicht über den MHC (major histocompatibility complex) und seine Produkte sowie die vorliegenden Untersuchungen der genetischen Regulation von IgE-Antworten gegeben werden.

B.4.1. Der MHC der Maus

Neben den Immunglobulinen ist eine zweite Molekülgruppe von besonderer Bedeutung, die der Histokompatibilitätsantigene. Sie wurden zuerst in der Maus entdeckt (Gorer, 1936), da es möglich war, Antiseren gegen sie zu produzieren und sie serologisch zu untersuchen. Wenn man Zellen oder Gewebe, die diese Moleküle trugen, in andere Individuen, die nicht exakt die gleichen Moleküle exprimierten, übertrug, wurden die verpflanzten Gewebe bzw. die Zellen abgestoßen und zerstört, was zur Namensgebung Histokompatibilitätsantigen führte (Gorer, Lyman und Snell, 1948); dabei fügten die Autoren noch eine serologische Nummer (2) hinzu und nannten die Gene, die für diese Antigene kodierten, H-2. Später zeigte sich dann, daß H-2 nicht nur aus einem, sondern vielen Genen bestand und es bildete sich der Name H-2-Komplex (Klein, 1975). Die gleichen Komplexe in anderen Spezies tragen andere Namen, wie z. B. HLA bei Mensch, Rt-1 bei Ratte, B bei Huhn. Der H-2-Komplex liegt auf dem mittleren Teil des Chromosoms 17, eines der kürzesten Mäusechromosomen und besteht aus mehreren Loci. Die Position eines jeden H-2-Lokus' auf der Chromosomenkarte wird durch die Typisierung von Rekombinanten heterozygoter Elterntiere festgestellt, in denen zwischen zwei Chromosomen 17 in genau einer Position des H-2-Komplexes ein Crossing-over stattgefunden hat (Klein, 1979). Wenn eine Rekombinante erneut in einen gleichen Prozeß mit einem anderen Partner verwickelt wird, kann wiederum eine neue Rekombinante entstehen usw., so daß die H-2-Chromosomen schließlich Allele verschiedenster Haplotypen aufweisen können und mittlerweile mehr als 60 solcher H-2-Rekombinanten im Mäusesystem zur Verfügung stehen (Klein, 1979). Die in Abbildung 5 dargestellte Einteilung des H-2-Komplexes der Maus in Regionen (K bis T) sowie der Unterteilung der I-Region in fünf Subregionen (A, B, J, E, C), die auf der Nomenklatur von Klein et al. (Klein, Flaherty, Van de Berg und Shreffler, 1978) beruht, ist durch einige neuere Untersuchungen der letzten Jahre sowie auch neuere gedankliche Konzepte abgeändert worden (Baxevanis, Nagy und Klein, 1981; Klein, 1981; Klein und Figueroa, 1981; Klein, Juretic, Baxevanis und Nagy, 1981). In der neuen Dar-

Regions and Subregions:



Abb. 5: Regionen und Subregionen des Major-Histokompatibilitätskomplexes der Maus (nach Klein et al., 1978).

Loci composing the mouse H-2 complex



Abb. 6: Chromosom 17 der Maus mit den Loci, die den H-2-Komplex bilden (nach Klein et al., 1981).

stellung des H-2-Komplexes der Maus (Abb. 6) sind nur diejenigen Lozi aufgezeichnet, von denen die Autoren (Klein und Figueroa, 1981) der Meinung sind, daß sie im engeren Sinn zum H-2-Komplex gehören, wobei die Reihenfolge zwischen A_{α} ; A_{β} und E_{β} sowie zwischen D und L noch nicht geklärt werden konnte. Die Bezeichnungen 'Region' bzw. 'Subregion' für bestimmte Chromosomensegmente werden dabei nicht mehr beibehalten sondern ein einzelnes Segment als 'Lokus' benannt. Innerhalb des H-2-Komplexes werden zwei verschiedene Klassen dieser Lozi postuliert. Zur Klasse I gehören der K- und D-Lokus sowie möglicherweise auch der L-Lokus, die Klasse II wird von A_{α} , A_{β} , E_{α} und E_{β} gebildet und unter Umständen auch vom J-Lokus, aber darüber fehlen noch eindeutige Ergebnisse (Klein und Figueroa, 1981). Beide Klassen unterscheiden sich in der Struktur der Moleküle, die sie kontrollieren, und in der Selektion der Antigene, deren Erkennung ihrer Restriktion unterliegt. Die Moleküle der Klasse I bestehen aus Polypeptidketten mit Molekulargewichten von 44 000 und 12 000 dalton, wobei die schwerere Kette in der Membran verankert ist. Dagegen sind die beiden Peptide der durch Klasse II kontrollierten Moleküle - mit Molekulargewichten der Ketten von 32 000 bzw. 28 000 dalton - in der Membran verankert (Klein, 1981). Klein definiert den MHC als eine Gruppe von Lozi, deren Produkten die Restriktion der Spezifität der Antigenerkennung durch T-Lymphozyten unterliegt; mit dieser Definition wäre auch die Einteilung beider Klassen von Lozi abgedeckt. Klein (1981) postuliert auch zwei Wege, auf denen die Existenz der MHC-Moleküle zu Tage treten: einen physiologischen, die natürliche Funktion des MHC aufzeigenden, und einen unphysiologischen, in dem die MHC-Moleküle selbst als Antigene agieren. Versuche, die den unphysiologischen Einfluß des MHC aufzeigen, sind Transplantatreaktion, 'Mixed-Lymphocyte'-Reaktionen (MLR), zellvermittelte Lymphotoxizität (CML) und Reaktionen vom Typ der verzögerten Allergie (DTH), welche alle gemeinsam von MHC-Molekülen stimuliert werden und auch auf sie gerichtet sind. Auf der anderen Seite stehen die Immune-Response (Ir)-Gen-kontrollierte Antikörperproduktion in vivo, die Antigen-stimulierte T-Zellproliferation in vitro

(Stimulierung durch nicht vom MHC kontrollierte Antigene), die MHC-restringierte zellvermittelte Lymphotoxizität gegen Antigene, die nicht im MHC kodiert sind und bestimmte Formen der MHC-restringierten Kontaktallergie bzw. DTH-Reaktionen. Ein einzelnes MHC-Molekül kann von jedem dieser Assays - physiologisch oder nicht - entdeckt werden, wenngleich das Molekül in einem Assay besser erfaßt werden kann als in einem anderen. Das führt zu der Aussage, daß es nicht spezielle Ir-Genprodukte, Ia-Antigene, MLR- und CML-stimulierende Moleküle usw. gibt, sondern dieses einzig verschiedene Erscheinungen des gleichen Moleküls sind (Klein, 1981). Die dargelegten Erkenntnisse und Gedanken zeigen, daß die Entdeckung der Funktion des MHC sowie die Interpretation noch längst nicht abgeschlossen sind. Es soll daher jetzt der Aspekt einer speziellen Funktion der MHC-Produkte, die Kontrolle der IgE-Antikörperproduktion, anhand der hierbei gemachten Untersuchungen dargelegt werden.

B.4.2. Kontrolle der IgE-Antwort

Nach Immunisierung von Mäusen mit DNP-KLH in Aluminiumhydroxyd fanden Revoltella und Ovary (1969) bei drei von sechs getesteten Mäusestämmen die Produktion von IgE-Antikörpern, während alle Stämme IgG₁-Antikörper bildeten. Die Untersuchungen von Vaz et al. zeigten dann einen Zusammenhang zwischen dem H-2-Genotyp und der Immunantwort gegen geringe Dosen von Ovalbumin (Vaz, Vaz und Levine, 1970). Immunisierung mit OA führte in H-2^b und H-2^q Mäusen zu guten und persistierenden IgE-Antworten, während H-2^k-Stämme und A/He-Mäuse (H-2^a) nicht antworteten. In weiteren Versuchen wurden verschiedene Antigene, Antigen Dosen, Mäusestämmen und Immunisierungsschemata in Bezug auf die genetische Abhängigkeit der IgE-Antwort getestet (Levine und Vaz, 1970). Bei wiederholter Immunisierung mit BGG (Schweine-Gamma-Globulin) - oder OM-Konjugaten (OM = Ovomocoid) in geringen Dosen (100 ng) - wurde eine Immunantwort in vier Mäusestämmen (A/He, CBA, C3H, AKR) gefunden, während andere (C57BL, C57L, SWR, SJL) nicht antworteten. Eine einzelne hohe Dosis (0,1 mg) von BGG-Konjugat induzierte die IgE-Antwort in allen Stämmen. Nach Gabe von geringen Antigen Dosen zeigte sich in den Responderstämmen neben der IgE- ebenfalls eine IgG-Antwort.

Das heißt: die Unterschiede zwischen den Mäusestämmen betrafen eher die Immunantwort allgemein als nur die IgE-Antwort, die allerdings in den Responderstämmen überwog. Eine hohe Immunantwort gegen BPO- und OM-Konjugate war mit H-2^a und H-2^k assoziiert, die geringen Antworten zeigten dagegen die Stämme mit den b-, d- und g-Allelen, was der genetischen Kontrolle gegen Ovalbumin (Vaz, Vaz und Levine, 1970) entgegengesetzt war. Es wurde weiterhin gezeigt, daß, obwohl Gene des H-2-Komplexes den größten Teil der Immunantwort von Inzuchtmäusen gegen OA und Ovomucoid kontrollierten, dennoch Abweichungen auftraten, die nicht der Präsenz eines einzigen H-2-Allels zugeschrieben werden konnten (Vaz, Phillips-Quagliata, Levine und Vaz, 1971). Denn von den H-2^k-Mäusen, die untersucht worden waren, zeigte der AKR/J-Stamm eine bessere Antwort gegen beide Antigene als die anderen Stämme des K-Haplotyps. Ebenso stellte sich heraus, daß (C57BL x DBA/2) F1-Mäuse bessere Antworten als beide Elternstämme und genetisch in Verwandtschaft stehende B10.D2-Mäuse produzierten (Vaz, De Souza und Sauerbronn Maia, 1974) und somit andere Faktoren, die die Immunantwort beeinflussen, wie z. B. Komplementärgene, nicht ausgeschlossen werden konnten. Der Identifizierung der an den H-2-Komplex gekoppelten Ir-Gene (Benacerraf und McDevitt, 1972) für verschiedene Antigene folgte dann kurze Zeit später die Charakterisierung eines Ir-Gens in Mäusen, das die IgE- und IgG-Antikörperantwort gegen 'Ragweed' kontrolliert (Dorf, Newburger, Hamaoka, Katz und Benacerraf, 1974). Die Responderstämme zeigten für beide Immunglobulin-klassen eine höhere primäre und sekundäre Immunantwort als die Nonrespondermäuse. Der Einfluß des sog. 'histamine-sensitizing factor' (HSF) von Bordetella pertussis wurde auch auf die IgE-Antwort gegen OA in verschiedenen Mäusestämmen untersucht (Lehrer, Vaughan und Tan, 1975). Es wurde gezeigt, daß der HSF sowohl die Produktion von IgE wie auch hämagglutinierender Antikörper steigerte. Die meisten der untersuchten Mäusestämme produzierten IgE-Antikörper, die Antworten differierten aber im Titer und der Dauer. Basierend auf den Antikörpertiter nach Sekundärimmunisierung wurden die Tiere in Highresponder, Intermediate- bis Lowresponder und Nonresponder eingeteilt, eine

eindeutige genetische Regulation dieser IgE-Antwort konnte aber nicht nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung der Infektion von Mäusen mit *Trichinella spiralis* konnte eine genetische Abhängigkeit der IgE-Antwort gezeigt werden (Rivera-Ortiz und Nussenzweig, 1976). Während alle untersuchten Stämme eine IgG₁-Antwort aufwiesen, war bezüglich der IgE-Produktion eine Unterteilung in Highresponder (C57L, A, DBA/1) und Nonresponder (SJL, AKR) zu treffen. In F1-Hybridmäusen aus diesen beiden Respondertypen wurden mittlere Immunantworten für beide Klassen, IgE und IgG₁, beobachtet. Experimente zum Vergleich der IgE-Antwort und der Produktion von hämagglutinierenden Antikörpern nach Immunisierung mit Ovalbumin von selektiv gezüchteten Mäuselinien, die bezüglich ihrer Antikörperantworten gegen Schafserythrozyten oder Bakterien als 'high'- oder 'low'-Linie zu klassifizieren sind, ergaben die folgenden Ergebnisse (Prouvost-Danon, Mouton, Abadie, Mevel und Biozzi, 1977). Die Kinetiken der Primär- und Sekundärantwort verliefen für alle drei Mäuselinien parallel ebenso wie für beide Antikörperklassen, wobei die IgE-Antwort bei Gabe höherer Antigendosen leicht supprimiert wurde. Die Antigendosen, die zur Induzierung einer Antikörperantwort nötig waren, differierten zwischen den drei Mäuselinien, waren jedoch für die Induktion der IgE- und Hämagglutinationsantwort gleich. Weiterhin bestand auch eine gute Korrelation zwischen der Produktion von IgE und hämagglutinierenden Antikörpern bei F2- und rückgekreuzten Mäusen, so daß in der Gesamtheit die Hypothese aufgestellt wurde, die Synthese von IgE- und hämagglutinierenden Antikörpern stehe unter einer gemeinsamen genetischen Kontrolle.

Nähere Untersuchungen von SJL-Mäusen, die im Gegensatz zu anderen Stämmen keine anti-Hapten IgE-Antikörper im System der Immunisierung mit DNP-KLH und der Infektion mit N.b. gebildet hatten (Kojima und Ovary, 1975 a), führten zu dem Ergebnis, daß die IgE-Produktion von SJL-Tieren durch unspezifische T-Suppressorzellen unterdrückt wird (Watanabe, Kojima und Ovary, 1976). Die Autoren konnten durch Experimente mit F1-Hybriden zwischen Balb/c (Highresponder) und SJL sowie Rück-

kreuzungen mit SJL zeigen, daß die Suppressorfunktion rezessiv durch ein autosomales Gen vererbt wurde und nicht H-2-abhängig war. Untersuchungen mit IgE-Lowrespondern (AKR) konnten diese Ergebnisse bestätigen, auch hier wurde der suppressive Effekt auf die IgE-Antwort durch ein autosomales Gen rezessiv vererbt (Watanabe und Ovary, 1978). Auch andere Autoren zeigten, daß zelluläre Suppressormechanismen (nicht antigenspezifisch aber klassenspezifisch für IgE) in der IgE-Antwort der Maus nicht von Ir-Genen des H-2-Komplexes abhängig waren (Chiorazzi, Fox und Katz, 1976; Chiorazzi, Fox und Katz, 1977). Sie kamen zu dem Schluß, daß die Zahl bzw. Potenz dieser Suppressorzellen in verschiedenen Inzuchtstämmen unabhängig von H-2-Haplotyp variiert: IgE-Highresponder wie Balb/c produzieren gegen die meisten Allergene nach Ausschaltung der unspezifischen Suppressormechanismen nur noch geringe spezifische IgE-Antikörper, während Lowresponder (AKR) oder Nonresponder (SJL) nach denselben Manipulationen IgE-Antikörper in gleichem Umfang wie unbehandelte Highresponder produzierten. So wurde von den Autoren die Hypothese erstellt, daß unter diesen experimentellen Bedingungen die Unterdrückung der IgE-Bildung nicht der phänotypische Ausdruck einer genetischen Unfähigkeit zur Antwort bestimmter Stämme sei sondern eher der Ausdruck ihrer genetischen Fähigkeit, die IgE-Produktion aktiv zu supprimieren. In einer weiteren Arbeit wurde demonstriert, daß der Suppressormechanismus auch dann funktionsfähig war, wenn nicht nur eine polyklonale Unterdrückung der IgE-Antwort auf ein H-2-unabhängiges Antigen sondern auch die Restriktion eines Antigens zur H-2-abhängigen genetischen Kontrolle vorlag (Chiorazzi, Tung und Katz, 1977). Es konnte nämlich nachgewiesen werden, daß das Fehlen einer IgE-Antwort von H-2^b-Mäusen gegen 'Ragweed' - kontrolliert durch ein Ir-Gen (s. o., Dorf et al., 1974) - durch Ausschaltung der Suppressormechanismen (Bestrahlung, Behandlung mit Cyclophosphamid) aufgehoben werden konnte, so daß die untersuchten C57BL/6-Mäuse spezifische IgE-Antikörper produzierten. Die Umwandlung von IgE-Lowrespondern in IgE-Highresponder durch Ausschaltung von Suppressorzellen konnte auch mit AKR-Mäusen demonstriert werden (Watanabe und Ovary, 1978). Sie fanden eben-

so, daß eine N.b.-Infektion die anti-Hapten-Antwort in AKR-Mäusen steigerte und dieser Einfluß den Effekt der Suppressorzellen überdecken konnte.

Die Untersuchungen im Mäusemodell haben also gezeigt, daß die genetische Regulation der IgE-Antikörperbildung sowohl über Ir-Gene, selektiv für bestimmte Antigene als auch über den Mechanismus antigen-unspezifischer T-Suppressorzellen gesteuert werden kann, wenngleich noch viele Fragen zum Verständnis der genetischen Kontrolle der IgE-Immunantwort offenstehen.

B.5. Problemstellung

In der Einleitung wurde ein Überblick über die Bedeutung des Immunglobulin E als molekularer Träger der allergischen Reaktion sowie über die zellulären Grundlagen der IgE-Antikörperantworten gegeben. Weiterhin wurden die charakteristischen Eigenschaften der Bildung dieses Immunglobulins anhand verschiedener Tiermodelle, insbesondere bei parasitären Wurminfektionen, dargestellt und über die Rolle von löslichen Faktoren bei der Regulation der IgE-Antwort berichtet. Abschließend wurden die bisher gewonnenen Erkenntnisse über die genetische Regulation der IgE-Antikörperantwort erläutert und somit alle Grundlagen, die den theoretischen Hintergrund und die Voraussetzungen dieser Arbeit bilden, in einer Übersicht dargelegt.

Es war die Zielsetzung dieser Arbeit,

- (1) den Kenntnisstand über die genetische Abhängigkeit der IgE-Produktion zu erweitern,
- (2) die IgE-Antikörperbildung in vivo regulativ zu beeinflussen und
- (3) die IgE-Synthese auf zellulärer Ebene in vitro zu untersuchen.

Die Gründe, die zur Wahl eines immunparasitologischen Modells (Infektion von Inzuchtmäusen mit dem Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis*) und der Untersuchung dieser Fragestellungen führten, sollen im folgenden erläutert werden.

(1) Wie schon in den Kapiteln B.1.4. (S. 6) und B.3.1. (S. 16) dargelegt wurde, werden Untersuchungen über das Immunglobulin E - seine Bildung und Regulation - durch die geringe Konzentration (Kap. B.1.4.) und - nach Immunisierung - auch nur kurze Persistenz (Kap. B.3.1.) dieses Immunglobulins erschwert. Es ist dagegen eine Besonderheit von parasitären Wurminfektionen, die IgE-Antikörperbildung sehr stark zu erhöhen. Parasitäre Infektionen erlangten daher nicht nur klinische Bedeutung, sondern werden auch in großem Umfang als Modellsysteme zur Untersuchung immunologischer Fragestellungen herangezogen (Kap. B.3.2., S. 21). Seit der Beschreibung reaginer Antikörper im Serum von Ratten, die mit dem Nematoden N.b. infiziert worden waren (Ogilvie, 1964), hat es viele Untersuchungen zur Biologie und Immunologie dieser parasitären Infektion gegeben. So wurde die Immunität und die Wirts-Parasitenbeziehung von N.b. in der Ratte (Ogilvie und Jones, 1971), die genetische Kontrolle der Anfälligkeit bzw. Resistenz gegen die parasitäre Infektion (Wakelin, 1978), genetische Unterschiede in der IgE-Produktion (Jarrett und Bazin, 1974), die Kinetik der IgE-Bildung (Jarrett, Haig und Bazin, 1976) und immunologische Parameter in vitro nach der Infektion von Ratten mit N.b. (Stockinger, 1979) eingehend untersucht. Während dagegen die Infektion von Mäusen mit N.b. eine sehr verbreitete Methode zur Potenzierung einer IgE-Antikörperantwort darstellt (Ovary, Itaya, Watanabe und Kojima, 1978), fehlten bisher Untersuchungen im Mäusemodell über die genetische Abhängigkeit und die Kinetik der IgE-Produktion im Verlauf der Infektion mit N.b. Diese Fragestellungen sollten daher an 36 Inzuchtstämmen erarbeitet werden. Durch die Generierung von monoklonalem Mäuse-IgE (Bohn und König, 1982 a, 1982 b) wurde es möglich, nicht nur die IgE-Antwort gegen ein bestimmtes Antigen (N.b.) sondern auch die totale IgE-Antikörperproduktion im Verlauf dieser parasitären Infektion nach der Etablierung eines quantitativen Radioimmunoassays zu bestimmen.

(2) Die Untersuchungen von Katz und Mitarbeitern (Katz und Tung, 1978; Tung, Chiorazzi und Katz, 1978) hatten gezeigt, daß im Serum von immunisierten Mäusen ein Faktor enthalten ist, der die IgE-Antikörperbildung in vivo supprimieren kann

(SFA). Es stellte sich daher die Frage, ob es auch im System der Infektion von Mäusen mit N.b. zur Bildung von Faktoren kommt, die die IgE-Produktion beeinflussen können. Zu diesem Fragenkomplex wurden daher Experimente durchgeführt, welche die Modulation der IgE-Antwort gegen N.b. in verschiedenen Mäusestämmen durch Applikation von Serum untersuchen sollten.

(3) Die Versuche zur IgE-Antwort in vivo führten zu der weiteren Fragestellung, ob die parasitäre Infektion von Mäusen mit N.b. auch in vitro die Synthese von IgE induziert. Hierbei sollte die IgE-Produktion von Zellen aus mesenterialen Lymphknoten und Milzen N.b.-infizierter und -reinfizierter Mäuse untersucht werden. Dabei wurde die N.b.-Infektion nicht zur Erzielung eines Carriereffektes benutzt, um die IgE-Antwort gegen ein Hapten zu potenzieren, sondern bildete den einzigen Stimulus zur Antikörperproduktion. Es ist bekannt, daß Mäuselymphozyten nach N.b.-Infektion Fc-Rezeptoren für IgE tragen (Chen, Bohn, Liu und Katz, 1981). Untersuchungen über die Synthese von Immunglobulin E in vitro wurden in dem System der Infektion von Mäusen mit N.b. jedoch nicht durchgeführt. Arbeiten im Rattensystem über die Stimulierung von MLN- und Milzzellen aus N.b.-infizierten Tieren durch verschiedene Mitogene und Parasitenantigene (Bloch, Towle und Mills, 1977; Stockinger, 1979) sowie über Stimulation und Regulation der IgE-Antwort in vitro im Humanmodell (Saxon und Stevens, 1979; Nonaka, Zuraw, O'Hair und Katz, 1981) führten zu der Fragestellung, ob die IgE-Synthese von Mäusezellen N.b.-infizierter Tiere durch verschiedene Mitogene oder parasitäre Antigene in vitro beeinflusst werden kann.

Es wurde schon früher gezeigt, daß Mäuseserum die Antikörpersynthese in vitro inhibieren kann (Bullock und Möller, 1972). Weiterhin konnte im Mäuseserum ein immunsuppressiver Faktor charakterisiert werden, der die Immunantwort von kultivierten Milzzellen gegen Schafserythrozyten supprimieren kann (Veit und Michael, 1973). Ebenso wurde der Effekt von Mäuseserum auf die Lymphozytentransformation in vitro (Nelson und Shneider, 1974) und die polyklonale B-Zellaktivierung (Smith und Hammarström, 1979; Walker, Sturtevant und Weigle, 1981 a, 1981 b), untersucht. Im Zusammenhang mit diesen und den Experimenten zur Mo-

dulation der IgE-Antwort in vivo durch Serum- bzw. Serumfaktoren sollte daher abschließend auch geprüft werden, ob die IgE-Synthese in vitro nach N.b.-Infektion durch Serum verschiedener Mäusestämme zu beeinflussen ist.

C. Material und Methoden

C.I. Material

C.I.1. Chemikalien und Gebrauchslösungen

Acetonitril	Fluka, Neu-Ulm
Äthylendiamintetra acetat tetra natriumsalz (EDTA)	Serva, Heidelberg
Agarose	Serva, Heidelberg
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromcyan	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloramin T (Trihydrat)	Merck, Darmstadt
Concanavalin A	Pharmazia, Freiburg
Coomassie Brilliantblau R 250	Merck, Darmstadt
N,N-Diäthyläthanolamin	Riedel - De Haen, Seelze
Dinatriumhydrogenphosphat-2- hydrat	Merck, Darmstadt
2,4-Dinitrophenol	Sigma, München
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Evans Blau	Merck, Darmstadt
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Heparin	Sigma, München
HEPES=(2- [4-(2-Hydroxyäthyl)- 1-pipera ziny] -äthansulfonsäure	Merck, Darmstadt
Kaliumcarbonat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Baker, Gross-Gerau
Kaliumhydrogenphosphat	Riedel - De Haen, Seelze
Kupfer (II)-Sulfat	Riedel - De Haen, Seelze
Lipopolysaccharid (Salmonella abortus equi)	Hermal, Hamburg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Merthiolat	Sigma, München
Methanol	Merck, Darmstadt
Müller-Hinton-Bouillon	Merck, Darmstadt

Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Riedel - De Haen, Seelze
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdisulfit	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-1-hydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxyd	Riedel - De Haen, Seelze
Natriumtartrat	Merck, Darmstadt
Nonidet P40	Merck, Darmstadt
Pokeweedmitogen	Sigma, München
Polyäthylenglycol (MG 4000)	Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin	Serva, Heidelberg
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sepharose 4B	Pharmazia, Freiburg
Tris (Hydroxymethyl) Aminomethan	Baker, Gross-Gerau
Typanblau-Lösung	Merck, Darmstadt
Türks Lösung	Merck, Darmstadt

C.1.2. Puffer und Lösungen

C.1.2.1. Physiologische Puffer

Borate-Buffered-Saline, pH 8,0 (BBS)

NaCl 180 g
 H_3BO_3 6,1 g
 ad 1 l Aqua dest.; diese Stammlösung (pH 7,1) wird zum Gebrauch 1 : 20 verdünnt.

Phosphate-Buffered-Saline, pH 7,2 (PBS)

NaCl 180 g
 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 28,66 g
 KH_2PO_4 5,34 g
 ad 1 l Aqua dest.; diese Stammlösung wird zum Gebrauch 1 : 20 verdünnt.

Dulbecco's Phosphate-Buffered-Saline, pH 7,2 (DPBS)

KCl	200	mg
KH_2PO_4	200	mg
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100	mg
NaCl	8	g
Na_2HPO_4	1,15	g
CaCl_2	100	mg
ad 1 l Aqua dest.		

C.I.2.2. Puffer zur Plasmagewinnung

NaCl	4,5	g
Heparin	67,6	mg
ad 500 ml Aqua dest.		

C.I.2.3. Reagenzien für die Jodierung von Proteinen

a) 0,02 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,3

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10,68	g
NaCl	26,30	g
ad 3 l Aqua dest.		

b) Chloramin T (1 mg/ml)

Chloramin T	20	mg
ad 20 ml Aqua dest.		

c) Natriumdisulfit (4,7 mg/ml)

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	47	mg
ad 10 ml Aqua dest.		

C.I.2.4. Lösungen für den Radioimmunoassay (RIA)

a) 0,4 m PBS + 10 % HS

100 ml	PBS-Stammlösung (20 x)
75 ml	HS
575 ml	Aqua dest.

b) 0,04 m PBS + 1 % HS

100 ml	Lösung a)
900 ml	Aqua dest.

C.I.2.5. Reagenzien zur Proteinbestimmung nach Lowry

Lösung A 1

2 g Natriumtartrat ad 100 ml Aqua dest.

Lösung A 2

1 g CuSO_4 ad 100 ml Aqua dest.

Lösung A 3

20 g Na_2CO_3 ad 1 l 0,1 N NaOH

Reagenz A (vor jeder Proteinbestimmung frisch angesetzt)

0,5 ml Lösung A 1

0,5 ml Lösung A 2

50 ml Lösung A 3

C.I.2.6. Reagenzien für die Immundiffusion nach Ouchterlony

Agarose

Agarose	1	%
---------	---	---

EDTA	0,005	M
------	-------	---

Na-Azid	0,01	%
---------	------	---

Die Reagenzien werden in Elektrodenpuffer (Merck, Darmstadt), pH 8,6, aufgelöst.

Färbelösung

Coomassie Blue R 250	1,25	g
----------------------	------	---

Essigsäure	46	ml
------------	----	----

Methanol	22,7	ml
----------	------	----

ad 500 ml Aqua dest.

Entfärber

Methanol	5	%
----------	---	---

Essigsäure	7,5	%
------------	-----	---

C.I.2.7. Puffer für die Affinitätschromatographie

0,01 M Phosphatpuffer 0,15 M NaCl, pH 7,2

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,38	g
--	------	---

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,78	g
---	------	---

NaCl	8,77	g
------	------	---

ad 1 l Aqua dest.

0,1 M Glycin/HCl, pH 2,7

Glycin 7,507 g

mit HCl auf pH 2,7 einstellen

ad 1 l Aqua dest.

1 M Tris/HCl, pH 8,5

Tris 121,14 g

mit HCl auf pH 8,5 einstellen

ad 1 l Aqua dest.

C.I.2.8. Puffer für die Herstellung von Immunadsorbentien

2 M K_2CO_3

K_2CO_3 27,64 g

ad 0,1 l Aqua dest.

0,1 M $NaHCO_3$

$NaHCO_3$ 8,4 g

ad 1 l Aqua dest.

0,1 M $NaHCO_3$ 0,5 M NaCl pH 9,0

NaCl 23,22 g

ad 1 l 0,1 M $NaHCO_3$

mit HCl auf pH 8,5 einstellen.

0,1 M Acetat 1M NaCl pH 4,0

Na-Acetat 13,61 g

NaCl 58,44 g

mit Essigsäure auf pH 4,0 einstellen

ad 1 l Aqua dest.

0,1 M Na-Phosphat 0,5 M NaCl pH 8,0

$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 35,58 g

NaCl 58,44 g

mit 0,1 M NaH_2PO_4 -Lösung auf pH 8,0 einstellen

ad 2 l Aqua dest.

1 M Äthanolamin

Äthanolamin 61,08 g

ad 1 l Aqua dest.

in 0,1 M Na-Phosphat 0,5 M NaCl pH 8,0.

0,02 Na-Phosphat 0,15 NaCl pH 7,3

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10,68 g

NaCl 26,3 g

mit 0,1 M NaH_2PO_4 -Lösung auf pH 7,3 einstellen

ad 3 l Aqua dest.

10^{-5} M Merthiolat

Merthiolat 4,1 mg

ad 1 l Aqua dest.

C.I.3. Agar zur Larvengewinnung von N.b.

Müller-Hinton-Bouillon 22 g

Bactoagar 20 g

ad 1 l Aqua dest.;

1 min. kochen, 10 min. autoklavieren.

C.I.4. Medien zur Zellkultivierung

RPMI 1640 + 10 % FCS

Dieses Medium wurde zur Kultur von Mäuselymphozyten verwendet. Es wurde als Trockenpulver von der Firma Flow Laboratories, Bonn, bezogen und enthielt folgende Zusätze:

HEPES 20 mM

Glutamin 2 mM

Weiterhin wurde dem Medium zugesetzt:

Penicillin/Streptomycin 100 IU/ml

FCS (Seromed, München; hitzeinaktiviert) 10 %

Pyruvat 1 mM

Zum Waschen der Zellen diente RPMI 1640 Medium, das nicht mit FCS angereichert worden war (= RPMI - Waschmedium).

DMEM

Dieses Medium wurde zur Züchtung von Hybridomzellen verwendet. Es wurde als Trockenpulver von der Firma Gibco, Karlsruhe, bezogen und enthielt 4,5 g Glucose/l. Dem Medium wurde zugesetzt:

Glutamin	2	mM
Pyruvat	1	mM
Streptomycin/Penicillin	100	IU/ml
Amphotericin B	2,5	µg/ml
Kanamycin	4	µg/ml
Neomycin	4	µg/ml
Pferdeserum (hitzeinaktiviert)	15	%
NaHCO ₃	3,7	g/l

Alle Zusätze wurden ebenfalls von Gibco, Karlsruhe, bezogen.

HAT

HAT-Medium diente als Selektionsmedium bei der Zellfusion und wurde durch Hinzufügung der drei aufgeführten Komponenten (Firma Sigma Chemie GmbH, München) zu DMEM erhalten:

Hypoxanthin	1	x 10 ⁻⁴ M
Aminopterin	4	x 10 ⁻⁷ M
Thymidin	1,6x	10 ⁻⁵ M

C.I.5. Mäuse

Alle Tiere stammten aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Ruhr-Universität Bochum. Die Mäuse wurden freundlicherweise von Dr. F. Falkenberg für die eigenständige Weiterzucht zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden Kreuzungen zwischen den Mäusestämmen Balb/c x A.CA und Balb/c x B10.M durchgeführt. Die männlichen und weiblichen Versuchstiere waren bei Versuchsbeginn zwischen 2 und 4 Monate alt.

C.II. Methoden

C.II.1. Infektion mit Nippostrongylus brasiliensis (N.b.)

C.II.1.1. Der Infektionszyklus in der Ratte

Der Infektionszyklus des Nematoden N.b. wird in Wistar-Ratten aufrechterhalten (Ogilvie, 1967; Ogilvie und Jones, 1973). Zu

diesem Zweck werden den Ratten 3 000 Larven des Parasiten subcutan in die Nackenhaut injiziert. Nach 6 und 7 Tagen werden die Faeces gesammelt und in Petrischalen kultiviert, deren Boden mit gesiebter, abgekochter Erde bedeckt ist. Weitere 10 bis 14 Tage später werden die Faeces dann mit flüssigem, 2 %igen Bacto-Agar übergossen. Nach Erstarrung des Agars wird dieser mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült und so die auf dem Agar befindlichen Larven (im Mittel 7000 bis 8 000 pro ml) gesammelt. Die Larven werden gewaschen, gezählt und innerhalb der nächsten zwei Stunden in nicht infizierte Ratten (3 000 Larven pro Tier) gespritzt, so daß der Infektionskreislauf geschlossen ist.

C.II.1.2. Infektion von Mäusen

Die Mäuse wurden mit 750, der - wie oben beschrieben - gewonnenen Larven des 3. Larvenstadiums am Tag 0 infiziert und nach 28 Tagen mit der gleichen Anzahl Larven von N.b. reinfiziert. Die Larven wurden den Mäusen in 0,3 ml physiologischer Kochsalzlösung subcutan unter die Nackenhaut injiziert.

C.II.2. Gewinnung von Mäuseserum bzw. -plasma

Die mit N.b. infizierten bzw. reinfizierten Mäuse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten im Infektionszyklus aus dem Retro-orbitalsinus des Auges geblutet. 0,2 ml Blut wurden sofort in 0,9 ml physiologischer NaCl-Lösung, die mit Heparin (10 U/ml) versetzt war, verdünnt. Das Blut wurde zentrifugiert (10 min., 1000 x g) und der Plasmaüberstand als 1 : 10 Verdünnung angenommen. Die Seren von jeweils 5 Mäusen wurden gepoolt und bei -20° C eingefroren. In den Versuchen zur Austestung der Seren einzelner Mäuse wurden 0,3 ml des Blutes dieser Tiere mit jeweils 1,35 ml heparinisierte Kochsalzlösung versetzt, was wiederum zu einer 1 : 10 Verdünnung des Plasmaüberstandes führte.

C.II.3. Gewinnung von CFA (Complete Freund's Adjuvans)- Immunserum

Mäusen wurde 0,25 ml CFA-Lösung (4 Teile Complete-Freund's-Adjuvans und 1 Teil 0,9 % NaCl) intraperitoneal injiziert (Tung, Chiorazzi und Katz, 1978; Katz und Tung, 1979). Am 7. und 8. Tag nach Immunisierung wurden die Tiere vom Retroorbitalsinus geblutet und das Serum 1 : 5 mit 0,9 % NaCl verdünnt.

C.II.4. Präparation von N.b.-Antigen

Das N.b.-Antigen wurde wie folgt präpariert (Ogilvie, Love, Jarra und Brown, 1977). Sieben Tage nach der Infektion von Ratten mit 3000 Larven von N.b. wurden die adulten Würmer aus dem kleinen Intestinum der Ratten gewonnen, durch mehrmalige Sedimentation in Kochsalzlösung gewaschen und anschließend mit einem Heidolph Homogenisator homogenisiert (5 min., 4° C). Nach Zentrifugation (17 000 x g, 1 h, 4° C) wurde der Überstand gegen PBS dialysiert und erneut zentrifugiert (17 000 x g, 30 min., 4° C). Der Proteingehalt des Überstandes wurde mit der Lowry Methode bestimmt und die Konzentration mit PBS auf 2mg/ml eingestellt. Die N.b.-Antigen-Präparation wurde in Aliquots von 1 ml bei -20° C eingefroren.

C.II.5. Passiv-cutane Anaphylaxiereaktion (PCA)

Die anti-N.b. IgE-Antikörper wurden mit der PCA-Reaktion in der Ratte bestimmt (Mota & Wong, 1969). Jeweils zwei Wistar-Ratten (Gewicht ca. 250 g) wurden parallel passiv sensibilisiert: ihnen wurden 0,1 ml einer fortlaufenden 1 : 2 Verdünnungsreihe (in PBS) der zu testenden Mäuseseren intradermal in die rasierete Rückenhaut injiziert. Nach zwei Stunden wurden dann 0,2 mg des homologen N.b.-Antigens in 1 ml einer 1 %igen Evan's Blaulösung (in NaCl) intravenös injiziert. 20 Minuten nach der Antigengabe wurden die Ratten getötet und die Reaktion auf der Innenseite der Rückenhaut beurteilt. Die höchste Verdünnung, die eine kreisrunde Färbung von mindestens 5 mm Durchmesser ergab, wurde als Endpunkt genommen.

Die anti-N.b. IgG₁-Antikörper wurden mit der PCA-Reaktion in SJL-Mäusen bestimmt (König, Okudaira und Ishizaka, 1974; Mota und Wong, 1969). Jeweils zwei Mäuse wurden durch intradermale Injektion von 0,05 ml einer fortlaufenden 1 : 2 Verdünnungsreihe (in PBS) der zu testenden Seren passiv sensibilisiert. Nach zwei Stunden wurde die Reaktion dann durch eine intravenöse Injektion von 0,1 mg N.b.-Antigen in 0,2 ml einer 1 %igen Evan's Blau-Lösung (in NaCl) aufgelöst, die Mäuse nach 20 Minuten getötet und die Reaktion auf der Innenseite der Rückenhaut beurteilt.

C.II.6. Präparation der Immunadsorbentien

Die Aktivierung von Sepharose 4B wurde nach der Methode von March, Parikh und Cuatrecasa (1974) durchgeführt. Sepharose 4B wurde in Aqua dest. suspendiert und über Nacht bei RT inkubiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde mit Aqua dest. gewaschen und danach 40 g Sepharose mit 80 ml K₂CO₃-Lösung versetzt. Nach Mischung von 16 g Bromcyan mit 16 ml Acetonitril wurde diese Lösung zu der Sepharose gegeben und 2 bis 3 Minuten geschüttelt. Dann wurde die Mischung mit 1 l Aqua dest. und 0,1 M NaHCO₃ gewaschen.

Zwanzig Gramm dieser so vorbereiteten nassen Sepharose wurden mit 300 mg DNP₄₃-BSA in 60 ml 0,1 M NaHCO₃ gemischt und 16 bis 20 Stunden bei 4° C gerührt. Danach wurde zentrifugiert (2 min., 1000 x g) und der Proteingehalt des Überstandes bestimmt. Das Protein-Sepharose-Konjugat wurde mit a) 0,1 M NaHCO₃ 0,5 M NaCl, pH 9,0, b) 0,1 M Na-Azetat 1 M NaCl, pH 4,0, c) 0,1 M Na-Phosphat, 0,5 M NaCl, pH 8,0 gewaschen und fünf Stunden (4° C) in 1 M Äthanolamin in 0,1 M Na-Phosphat, 0,5 M NaCl, pH 8,0 gerührt. Danach wurde das Gel mit 0,02 M Na-Phosphat, 0,15 M NaCl, pH 7,3 gewaschen und in Gegenwart von 10⁻⁵ M Merthiolat aufbewahrt.

Die gleichen Präparationsschritte wurden für affinitätschromatographisch gereinigtes IgE (2 g aktivierte Sepharose mit 18 mg IgE) bzw. einem (NH₄)₂SO₄-Präzipitat (50 %) von Mäuse-Immunglobulin (1,5 mg aktivierte Sepharose mit 1,1 g Mäuse-Immunglobulin) durchgeführt.

C.II.7. Immunglobuline der Maus

IgG₁

Maus IgG₁ (MOPC 21) wurde von der Firma Bionetics, Kensington, USA, erworben.

IgE

Maus IgE wurde nach den von Bohn und König (1982 a, b) beschriebenen Methoden präpariert und gereinigt. Weibliche Balb/c Mäuse wurden i. p. mit 1 µg DNP-OA immunisiert (Tag 0) und am 21. Tag mit 750 Larven von N.b. infiziert. Die Mäuse wurden an Tag 35 getötet und die Milzzellen dieser Tiere in bestrahlte (600 rad) syngene Mäuse transferiert ($3 - 4 \times 10^7$ Zellen pro Tier). Die Empfängermause wurden gleichzeitig mit 10 µg DNP-N.b.-Protein immunisiert. Eine Woche nach diesem adoptiven Zelltransfer wurden die Milzzellen der immunisierten Mäuse mit NS1-Myelomzellen (Köhler und Milstein, 1976) fusioniert. Dazu wurden die Mausmilzzellen (1×10^8) mit den NS1-Zellen ($1 - 2 \times 10^7$) gemischt und abzentrifugiert (10 min., 100 x g). Der Überstand wurde abdekantiert und zu dem Pellet wurde PEG 4000 (1,5 ml, 41,3 %) in DPBS (vorgewärmt bei 37° C) zugegeben und eine Minute lang gemischt. Danach wurden sofort 30 ml vorgewärmtes DMEM-Medium (ohne HS und Zusätze, vgl. C.I.4.) tropfenweise in einem Zeitraum von 10 Minuten zugegeben. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min., 100 x g) in 10 ml DMEM (mit HS und Zusätzen) resuspendiert und eine Stunde bei 37° C inkubiert. Die Zellen wurden mit 20 ml vorgewärmten HAT-Medium (C.I.4.) verdünnt und in elf 96-Loch-Mikrotiterplatten (Costar, Nr. 3596, Cambridge, Mass., USA) verteilt ($2 - 4 \times 10^4$ NS1-Zellen pro Loch). Zu jedem Ansatz wurden noch Feederzellen (Milz- und Thymuszellen) von syngeneten, nicht immunisierten Mäusen in einer Konzentration von $2 - 3 \times 10^5$ Zellen pro Loch zugegeben. Die Kulturen wurden bei 37° C in 7 % CO₂-Atmosphäre kultiviert (Begasungsbrutschrank B 5060 EK/CO₂, Heraeus GmbH, Hanau) und täglich mit einem Tropfen HAT-Medium gefüttert. Neun bis elf Tage nach der Fusion wurde das alte Medium entfernt und durch neues ersetzt, welches alle 3 bis 4 Tage gewechselt wurde.

Nach drei bis vier Wochen wurden die Zellen zweimal mit HT-Medium (HAT-Medium ohne Aminopterin) gefüttert und danach in normalem DMEM ohne HAT-Zusätze kultiviert. Gut gewachsene Kulturen wurden in 24-Loch-Platten (Costar, Nr. 3524, Cambridge, Mass., USA) transferiert, um größere Mengen von Kulturüberständen zu erhalten. Die anti-DNP IgE-Antikörper in den Zellkulturüberständen wurden mit der PCA-Reaktion in der Ratte getestet (vgl. C.II.5.). Dabei wurde die Reaktion nach zwei Stunden durch eine i.v.-Injektion von 1 mg DNP-BSA in 1 % Evans Blau ausgelöst. Hybridomzellen, die DNP-spezifisches IgE produzierten, wurden nach der Softagar-Technik (Köhler, 1979) geklont und in Zellkulturflaschen (250 ml, Nr. 658170, Greiner, Nürtingen) kultiviert. Es wurden so größere Mengen von Kulturüberstand erhalten, aus dem die anti-DNP Antikörper affinitätschromatographisch gereinigt wurden (Bohn und König, 1982 b). Ein Liter Kulturüberstand wurde langsam zu 9 ml DNP-BSA-Sepharose gegeben. Die Säule wurde mit 200 ml 0,01 M Na-Phosphatpuffer, 0,15 M NaCl, pH 7,2, 200 ml PBS plus 1 % NP-40 und nochmals mit PBS gewaschen. Die adsorbierten, DNP-spezifischen Immunglobuline wurden mit 1 M DNP in PBS (50 - 100 ml) eluiert und die Fraktionen (2 ml) anschließend auf eine Dowex Ionen-austauscher-Säule (10 - 20 ml), die mit PBS äquilibriert war, aufgetragen, um das gebundene und freie DNP zu entfernen. Die biologische Aktivität der IgE-haltigen Fraktionen wurde wiederum mit der PCA-Reaktion in der Ratte bestimmt. Die Typisierung der schweren und leichten Ketten der gereinigten monoklonalen Antikörper wurde durch die doppelte Immundiffusion nach Ouchterlony gegen monospezifisches Antiserum durchgeführt. Nach dieser Methode gereinigtes, monoklonales DNP-spezifisches IgE wurde von Dr. Bohn zur Verfügung gestellt.

C.II.8. Antiseren

FIIC-konjugiertes Antiserum

Das für fluoreszenzserologische Untersuchungen benötigte fluoresceinkonjugierte Kaninchen-anti-Maus-Fab Antiserum wurde von der Firma Nordic (Tilburg, Niederlande) bezogen.

Anti-Maus IgG₁

Anti-Maus IgG₁ stammte von der Firma Meloy Laboratories Inc., Springfield, USA.

Anti-Maus-IgE_vom Meerschweinchen

Meerschweinchen wurden mit gereinigtem, monoklonalem IgE (vgl. C.II.7.) immunisiert. Den Tieren wurde am Tag 0 IgE (0,5 mg) in 1 ml CFA intracutan injiziert. Am Tag 21 (0,5 mg IgE in 1 ml CFA) und 42 (0,5 mg IgE in 1 ml 0,9 % NaCl) erhielten sie jeweils Boosterinjektionen und wurden am 46. Tag durch Herzpunktion entblutet. Um das Serum von mit Maus-IgG, -IgM und -IgA kreuzreagierenden Antikörpern zu reinigen, wurden 20 ml Meer-schweinchen-Antiserum zweimal mit 14 ml Maus-Immunglobulin (50 % Ammoniumsulfatpräzipitat) adsorbiert. Das Maus-Immunglo-bulin war an Sepharose 4B gekuppelt, die Säule mit 0,01 M Phosphat 0,15 M NaCl, pH 7,2 äquilibriert, als Elutionsmittel diente PBS-Puffer. Anschließend wurden 1,5 ml IgE (gekuppelt an Sepharose) in eine Pasteurpipette gefüllt, mit PBS-Puffer gewaschen und mit jeweils 1,5 ml-Portionen des gereinigten Meerschweinchen anti-Maus IgE für 15 min. inkubiert. Die Säule wurde mit PBS gewaschen und mit 0,1 M Glycin/HCl, pH 2,7 eluiert. Jeweils 0,5 ml des Eluats wurden in 0,5 ml Tris/HCl, pH 8,5 aufgefangen. Die Proteinkonzentration der Fraktionen wurde photometrisch ($\lambda = 280 \text{ nm}$) bestimmt, die Fraktionen gepoolt und in der doppelten Immundiffusion nach Ouchterlony gegen ge-reinigtes IgE getestet und anschließend gegen PBS dialysiert.

C.II.9. Markierung der Proteine mit ^{125}J

Die Proteine wurden nach der Methode von Klinman und Taylor (1969) jodiert. Anti-Maus IgE bzw. Maus-IgG₁ wurden gegen Na-Phosphatpuffer dialysiert und in ein Plastikröhrchen (Greiner, Nürtingen, 4,5 ml Volumen) überführt. 300 μg anti-Maus IgE wur-den mit 3 mCi Na^{125}J , 200 μg Maus IgG₁ mit 2 mCi Na^{125}J (10 mCi in 100 μl , Amersham Buchler, Braunschweig) versetzt. Die Reak-tion wurde mit 0,2 ml Chloramin T (1 mg/ml) gestartet und nach 1 min. stoppte die Zugabe eines Überschusses von Natriumdisul-fit (0,2 ml; 4,7 mg/ml) die Jodierung. Nach einer Minute wurde

dann durch Zugabe von BSA (3 % in Aqua dest.) das Endvolumen von 1 ml erreicht. Die markierten Proteine wurden in vorbereitete Dialyseschläuche überführt und bei Raumtemperatur zweimal für 18 Stunden gegen physiologischen BBS-Puffer dialysiert. Anschließend wurden die Proteinpräparationen aus den Schläuchen entfernt und bei 4° C bzw. in Aliquots von 20 µl bei -70° C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

C.II.10. Radioimmunoassay (RIA)

C.II.10.1. Solid-Phase-RIA zur IgE-Bestimmung

Der Solid-Phase-RIA zur quantitativen Bestimmung des totalen IgE in Mäuseseren bzw. Zellkultur-Überständen wurde - modifiziert - nach der Doppel-Antikörpermethode von Saxon, Morrow und Stevens (1980), durchgeführt. Es wurden Removawell U-Boden-Becherchen aus Polystyrol (M 174 A, Dynatech, Denkendorf) verwendet, die mit 0,1 ml anti-Maus IgE (verdünnt in PBS, 75 µg/ml) für drei Stunden bei 37° C gecooatet wurden. Nach der Inkubation wurde die Antikörperlösung abgesaugt und die Wells dreimal mit 1 % Pferdeserum (HS) in 0,04 m PBS gewaschen. Um die noch freien Proteinbindungsstellen der Plastikoberfläche abzusättigen, wurden die Wells mit 10 % HS in 0,4 m PBS (0,25 ml) gefüllt und drei Stunden bei 37° C inkubiert. Nach erneutem Waschen der Wells (1 % HS in 0,04 m PBS) wurden diese entweder bis zum Gebrauch bei -20° C aufbewahrt oder direkt mit den zu testenden Proben (0,1 ml) gefüllt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Wells wurden bei sämtlichen Inkubationen sorgfältig mit Aluminiumfolie abgedeckt, um Flüssigkeitsverluste durch Verdunstung auszuschließen. Nach Absaugen der Proben wurden die Wells dreimal mit 1 % HS in 0,04 m PBS gewaschen und mit 0,1 ml des ¹²⁵J-markierten anti-Maus IgE (0,15 µg/ml, 100 000 cpm) gefüllt. Die spezifische Aktivität der Antikörperpräparation lag je nach Alter zwischen 0,25 µCi und 0,5 µCi pro µg Protein. Nach vier Stunden Inkubation bei 37° C und Absaugen des markierten Antikörpers wurden die Wells dreimal mit 1 % HS in 0,04 m PBS und fünfmal mit Leitungswasser gewaschen, trockengesaugt und die gebundene Radioaktivität in einem automatischen Gamma-Counter (LB MAG 312, Berthold, Wildbad) gemessen.

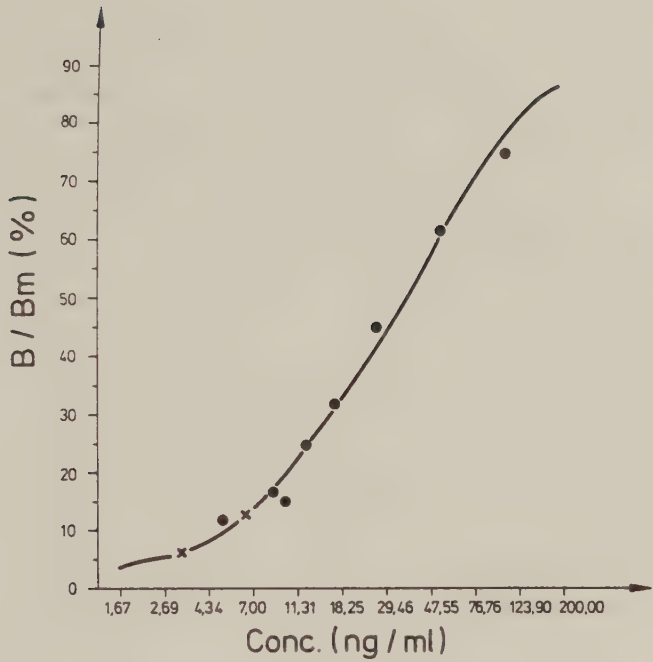


Abb. 7: Standardkurve des Solid-Phase-Radioimmunoassays zur Messung von Mäuse-IgE.
Ordinate: B/B_m (%); B_m = Probe mit der maximal gebundenen Radioaktivität;
 B = gebundene Radioaktivität der Testprobe;
Abszisse: IgE-Konzentration (ng/ml)

Für jedes Experiment wurde parallel zur Probenaustestung eine Standardkurve mit Maus-IgE (1D9N, 0,28 mg/ml) gemessen (Abb. 7). Anstelle der Testproben wurden die Standard-IgE-Verdünnungen (0,7 - 180 ng/ml) in die Wells gefüllt (0,1 ml) und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden abgesaugt, dreimal mit 1 % HS in 0,04 m PBS gewaschen und die Wells mit dem ^{125}J -markierten anti-Maus IgE gefüllt (0,1 ml), nach der Inkubation gewaschen und gemessen, wie es für die Testproben beschrieben worden ist. Mit Hilfe der eingesetzten Standardkurve konnten die IgE-Konzentrationen der Testproben bestimmt werden. Durch den Einsatz einer zweiten anti-Maus IgE Präparation (eingesetzte Verdünnung: 0,2 µg/ml) konnte die Sensibilität des RIA auf 1 ng/ml gesteigert werden.

C.II.10.2. RIA zur IgG₁-Bestimmung

Das Serum-IgG₁ wurde durch einen RIA bestimmt, der auf Material und Methode des beschriebenen Radioimmunoassays zur IgE-Bestimmung basiert. Die Wells wurden mit 0,2 ml einer anti-Maus IgG₁ Antikörperlösung (47 µg/ml in PBS) für drei Stunden bei 37° C gecoatet. Nach den Waschvorgängen bzw. dem Nachcoaten mit 10 % HS in 0,4 m PBS wurden sodann 0,1 ml der Serumproben und 0,1 ml des ^{125}J -markierten Maus-IgG₁ (1 µg/ml, 100 000 cpm) gleichzeitig in die Wells gefüllt und vier Stunden bei 37° C inkubiert (Prinzip der kompetitiven Bindung). Danach wurde, wie beschrieben, gewaschen und die gebundene Radioaktivität gemessen. Parallel zur Messung der Serumproben wurde eine Standardkurve mit Maus-IgG₁ (0,02 - 10 µg/ml) gemessen, mit deren Hilfe die IgG₁-Konzentrationen der Serumproben bestimmt werden konnte. Die spezifische Aktivität des radioaktiv markierten IgG₁ betrug 0,5 µCi pro µg Protein.

C.II.11. In vitro Zellkulturen von Mäusezellen

C.II.11.1. Zellpräparation

Für die Untersuchungen der IgE-Synthese in vitro wurden Zellen aus Milz und mesenterialen Lymphknoten (MLN) von Mäusen verwendet und in RPMI 1640-Medium (siehe C.I.4.) bei 37° C und

5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Für jeden einzelnen Versuch wurden zwei Mäuse entblutet, getötet, auf Eis gelegt und die Organe unter sterilen Bedingungen entnommen (Gelaire Laminar Air Flow, Class 100, Gelman Instruments, Ann Arbor, Michigan, USA). Diese wurden in einer kleinen Petrischale (Ø 60 mm, Greiner, Nürtingen) in RPMI 1640-Waschmedium (siehe C.I.4.) unter Zuhilfenahme von zwei gebogenen Pinzetten restlos zerdrückt. Die so erhaltene Gesamtzellsuspension wurde mit einer Pasteurpinzette in ein Plastikröhrchen (15 ml, Falcon, Nr. 2095, Becton Dickinson, Heidelberg) überführt und die Petrischale mit Waschmedium nachgespült. Nachdem die groben Gewebebestandteile sedimentiert waren (5 min.), wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und zentrifugiert (10 min., 150 x g). Der Überstand wurde abdekantiert, das Zellpellet in 15 ml Waschmedium aufgenommen und die Zellen ein zweites Mal zentrifugiert (10 min., 150 x g). Der Überstand wurde danach dekantiert und die Zellen in 5 ml RPMI 1640-Kulturmedium (siehe C.I.4.) aufgenommen. Nach Zählung der Zellen wurde die gewünschte Konzentration durch Verdünnung mit Kulturmedium eingestellt und die Zellen in die Kulturplatten (Costar, Nr. 3524, Cambridge, Mass., USA) eingefüllt (1 ml Zellsuspension pro Loch).

C.II.11.2. Zellzählung

Die Zellbestimmungen wurden in einem Hämatozytometer nach Neubauer durchgeführt. Eine Probe der hergestellten Zellsuspension wurde mit Türks Lösung verdünnt (1 : 20), dadurch wurden die Erythrozyten lysiert und die Lymphozyten angefärbt. Die Zellen wurden in die Neubauerkammer gefüllt und - nachdem sie sedimentiert waren - die Zellzahl in vier Eckquadraten (Kantenlänge 1 mm, Höhe 0,1 mm) der Zählkammer bestimmt. Aus der Zellzahl dieses definierten Volumens und der verwendeten Verdünnung konnte die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension berechnet werden.

C.II.11.3. Viabilitätsbestimmung

Die Methode der Zellzählung mit Türks Lösung ermöglicht keine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen. Der ge-

bräuchlichste Test, das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen zu bestimmen, beruht darauf, daß lebende Zellen die Fähigkeit besitzen, das Eindringen von bestimmten Farbstoffen (Trypanblau) in das Zytoplasma zu verhindern. Zur Bestimmung der Viabilitätsrate der Milz- und MLN-Zellen wurde daher eine Probe der Zellsuspension in Trypanblau-Gebrauchslösung aufgenommen und nach fünf Minuten Inkubation das Verhältnis von lebenden (nicht angefärbten) und toten (blau-angefärbten, bläsig vergrößerten) Zellen in der Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Viabilitätsrate der Zellen, die nach der beschriebenen Methode (C.II.11.1.) gewonnen worden waren, betrug konstant 98 - 99 %.

C.II.12. Lymphozytentransformation

Zur Bestimmung der DNA-Syntheseleistung wurde die Einbaurrate von Tritium-markiertem Thymidin durch Mäuselymphozyten bestimmt. Dazu wurden 0,2 ml der - wie in C.II.11.1. beschrieben - präparierten Mäusezellsuspensionen in Mikrotiterplatten (Costar, Nr. 3596, Cambridge, Mass., USA) für vier Tage kultiviert (37° C; 5 % CO₂-Atmosphäre). Dann wurden 0,2 µCi ³H-Thymidin (1 mCi/ml, Amersham Buchler, Braunschweig) pro Ansatz zupipettiert. Nach weiteren vier Stunden Inkubation (37° C, 5 % CO₂-Atmosphäre) wurden die Zellen mit einem Titertek Cell Harvester (Fa. Flow, Bonn) auf Zellulosefiltern (Titertek, Cell Harvester Filter, Fa. Flow, Bonn) geerntet, die Filter getrocknet (1 h, 60° C), in 3 ml Szintillator (Hydroluma, Nr. 8584, Baker, Gross-Gerau) aufgenommen und die Radioaktivität in einem Flüssigkeits-Szintillationsmeßgerät (Packard Tri-Carb, Liquid Scintillation Spectrometer 3255, Packard Instruments, Frankfurt/M.) gemessen.

C.II.13. Proteinbestimmung

C.II.13.1. Photometrische Methode

Proteinkonzentrationen von Eluaten der Immunadsorbenssäulen wurden photometrisch ($\lambda = 280 \text{ nm}$) bestimmt.

C.II.13.2. Nach Lowry (1951)

Zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentrationen verschiedener Lösungen wurde die Methode von Lowry (1951) angewandt. 200 µl der unbekannten Proteinlösung wurden mit 1 ml Reagenz A (siehe C.I.1.5.) versetzt und sofort gemischt. Nach zehn Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde 0,1 ml Folin-Ciocalteu-Reagenz (1 : 1 verdünnt in Aqua dest.) zugegeben und die Proben sofort gut geschüttelt und in Dunkelheit für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Extinktion bei 500 nm bzw. 720 nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer mit BSA aufgestellten Eichkurve bestimmt.

C.II.14. Immundiffusion nach Ouchterlony (1958, 1962)

Zum qualitativen Nachweis verschiedener Antigene wurden diese mit entsprechenden Antiseren in der doppelten, radialen Immundiffusion nach Ouchterlony ausgetestet. Dazu wurden Objektträger (76 mm x 26 mm) mit einem 1 %igen, 1 mm dicken Immunelektrophoreseagar beschichtet. In dieses Gel wurden mit einem Metallstempel (Gelman Instruments, Ann Arbor, Michigan, USA) Löcher gestanzt und in diese jeweils 10 µl Antigen und Antikörper gegeneinander eingefüllt. Während der Diffusionszeit von 24 Stunden wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer aufbewahrt, die Präzipitationsbanden wurden danach mit Coomassie-Brilliantblau angefärbt.

C.II.15. Ammoniumsulfatpräzipitation von Mäuseseren

Die grobe Auftrennung der Serumproteine verschiedener Mäuseseren wurde durch eine 0 bis 33 %ige, 33 bis 50 %ige und 50 bis 70 %ige Sättigung der Seren mit Ammoniumsulfat nach der Methode von Campbell (1970) erreicht. Dem Serum wurde unter ständigem Rühren tropfenweise die gesättigte Ammoniumsulfatlösung, deren pH-Wert mit 1 M NaOH auf pH 7,8 eingestellt war, zugegeben und das gesättigte Serum noch weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 30 Minuten zentrifugiert (15 000 x g), der Überstand abdekantiert, das Präzipitat in physiologischem PBS-Puffer aufgenommen und gegen PBS dialysiert.

C.II.16. Indirekte Immunfluoreszenz

Zum Nachweis von Antikörpern gegen adulte N.b.-Würmer bzw. -Larven in Mäuseseren wurden die Seren von Tieren, die mit Larven von N.b. infiziert bzw. reinfiziert worden waren, mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Jeweils zehn adulte Würmer - gewonnen aus Ratten am Tag 5 und 6 nach Infektion, vgl. C.II.4. - in 100 µl DPBS bzw. 50 Larven - vgl. C.II.1.1. - in dem gleichen Volumen DPBS wurden mit 50 µl der zu testenden Seren in Polystyrol-Röhrchen (7 mm x 50 mm, Nr. 100 101, Greiner, Nürtingen) für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit vorsichtig abgesaugt und dreimal mit DPBS-Puffer, der mit 0,1 % BSA und 0,1 % Kaninchennormalserum (KNS) versetzt war, gewaschen. D. h.: die Röhrchen wurden mit Waschpuffer gefüllt und - nach dem Absinken der Würmer bzw. Larven auf den Boden - erneut abgesaugt. Danach wurden in jedes Röhrchen 50 µl des in DPBS verdünnten (1 : 20) FITC-markierten Kaninchen-anti-Maus-Fab Antiserums zugegeben und erneut 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 % BSA, 0,1 % KNS in DPBS wurde bis auf einen Flüssigkeitsrest von 50 µl abgesaugt und Würmer bzw. Larven auf Objektträger transferiert und mit Deckgläsern (25 mm x 40 mm) abgedeckt. Die Objektträger wurden in feuchten Kammern in der Kälte (4° C) aufbewahrt und die Präparate sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leitz, Wetzlar) betrachtet.

D. Ergebnisse

D.I. Die IgE-Antkörperantwort gegen N.b. in vivo

D.I.1. Studien über die spezifische IgE-Produktion

D.I.1.1. Die Austestung von 36 verschiedenen Mäusestämmen

Die Untersuchung der spezifischen IgE-Antikörperproduktion gegen N.b. wurde an 36 verschiedenen Mäusestämmen durchgeführt. Dabei wurde das in Abbildung 8 dargestellte Infektions- und Blutungsschema angewendet. Die Gruppen von je fünf Mäusen wurden mit jeweils 750 Larven des 3. Larvenstadiums infiziert und mit der gleichen Anzahl von 750 Larven auch reinfiziert. Die Infektion von Mäusen mit 750 Larven N.b. zur Potenzierung der IgE-Antwort ist in vielen Modellen der Immunisierung eine gebräuchliche Methode (Ovary, Itaya, Watanabe und Kojima, 1978); dies war der Anlaß, die hier durchgeführten Untersuchungen nach diesem Schema durchzuführen. Die Mäuse wurden auch bei der Zweitinfektion (= Reinfektion) mit 750 Larven infiziert, da sich bei Vorversuchen gezeigt hatte, daß die Reinfektion mit 1500 Larven zu einer Mortalität von über 50 % der Tiere innerhalb der ersten drei Tage nach Larveninjektion führte. Versuche zur Bestimmung der LD₅₀ wurden nicht durchgeführt; in Testversuchen wurde die Infektion von Tieren mit 1000 Larven vorgenommen, wobei eine große Anzahl von Mäusen (30 % - 40 %) innerhalb der ersten Woche nach Infektion starb. Dagegen wurden bei allen Experimenten mit 750 Larven nur vereinzelte Todesfälle beobachtet (2 % - 3 %).

Die von den Tieren einer Gruppe gewonnenen Seren wurden gepoolt und verschiedene Verdünnungen dieser Poolseren dann in der PCA-Reaktion ausgetestet und der Gehalt an spezifischen IgE-Antikörpern gegen N.b. als reziproker Verdünnungstiter angegeben. Mit Ausnahme von SJL-Mäusen (nur weibliche Tiere) sowie den Stämmen B10.S, B10.A und B10.S (9R) - nur männliche Tiere - wurden jeweils sowohl männliche als auch weibliche Mäuse untersucht. Es zeigten sich bei allen untersuchten Tieren keine geschlechtsspezifischen Unterschiede, d. h. sowohl männ-

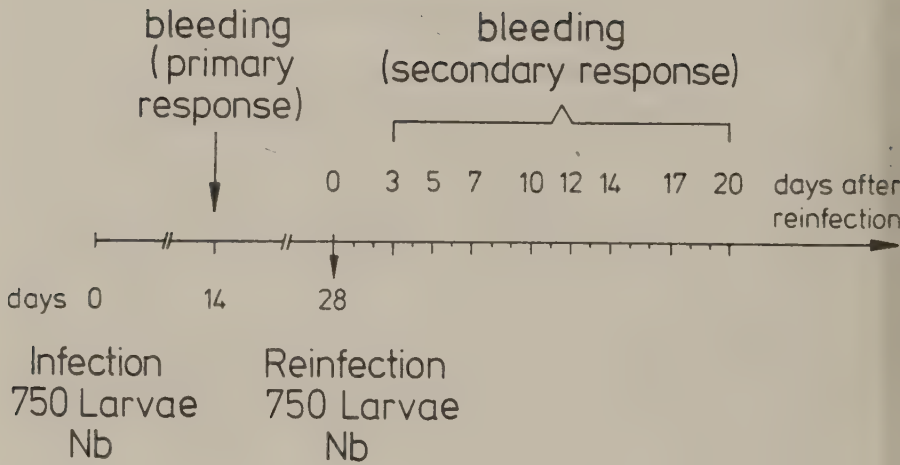


Abb. 8: Immunisierungs- und Blutungsschema der Versuche zur Bestimmung von IgE-Antikörpern in Mäuseseren nach Infektion mit N.b.

liche als auch weibliche Mäuse produzierten spezifische IgE-Antikörper gegen N.b. oder bei beiden Gruppen konnte keine IgE-Antwort nachgewiesen werden.

D.I.1.1.1. Die Stärke der IgE-Immunantwort:

Einteilung in Respondergruppen

Die spezifische IgE-Antwort nach Infektion und Reinfektion der 36 Mäusestämme ist in Tabelle 1 a und b aufgelistet. Es zeigte sich, dass 23 Stämme (Tab. 1 a) kein antigenspezifisches IgE produzieren, dagegen 13 Mäusestämme (Tab. 1 b) eine mehr oder weniger deutliche IgE-Antwort zeigen. In der Tabelle ist für jeden Stamm der höchste Titer dargestellt, der im Verlauf der Infektion erreicht worden ist. In der Regel tritt das Maximum der spezifischen IgE-Produktion im Serum an den Tagen 7 bis 10 nach Reinfektion auf (s. u.). Aus Tabelle 1 b geht hervor, daß deutliche Unterschiede der IgE-Antwort zwischen den Responderstämmen bestehen. Es wurde daher eine - auf der Höhe der PCA-Titer basierende - willkürliche Klassifizierung in verschiedene Respondertypen vorgenommen. Mäuse mit einem PCA-Titer größer als 1 : 640 wurden als Highresponder (HR) bezeichnet, die Tiere mit einem Titer zwischen 1 : 160 und 1 : 320 als Mediumresponder (MR) und die Gruppe der Mäusestämme mit PCA-Titern kleiner als 1 : 160 als Lowresponder (LR). Analog wurden alle Mäuse, die keine spezifischen IgE-Antikörper gegen N.b. produzierten, der Nonresponder-Gruppe (NR) zugeteilt. Wie aus der Tabelle 1 b hervorgeht, kommt es in der Erstinfektion mit N.b. (getestet am 14. Tag nach Infektion) nur in den beiden HR-Stämmen A.CA und B10.M zu einer geringen spezifischen IgE-Produktion (PCA-Titer 1 : 40 bzw. 1 : 80); bei allen anderen untersuchten Stämmen waren in der Erstinfektion keine spezifischen Antikörper gegen N.b. in der PCA-Reaktion nachzuweisen.

In der Erstinfektion wurde die IgE-Produktion am Tag 14 nach erfolgter Infektion untersucht, dagegen wurden die Mäuse nach der Reinfektion, in deren Verlauf auch die verstärkte Bildung von spezifischen IgE-Antikörpern zu erwarten war (vgl. Kap. B.3.2.1.2.), an acht verschiedenen Zeitpunkten geblutet, um eine Kinetik der spezifischen IgE-Produktion erstellen zu können.

STRAIN	H-2 HAPLOTYPE	STRAIN	H-2 HAPLOTYPE
A/WySn	A	B 10.AKM	M
B 10.A	A	B 10.DA (80NS)	QP1
A.AL	A1	SJL	S
A.TFR 1	AN 1	A.SW	S
C57BL/6	B	B 10.S	S
A.By	B	A.TL	T1
BALB/cJ	D	B 10.S (7R)	T2
B10.D2	D	B 10.HTT	T3
B 10.A (3R)	I3	B 10.S (9R)	T4
B 10.A (5R)	I5	B 10.PL (73NS)	U
AKR/CU	K	B 10.T (6R)	Y2
C ₃ H/DISN	K		

Tab. 1 a: Auflistung derjenigen Mäusestämme und ihres H-2-Haplotyps, die im Verlauf der Infektion keine spezifische IgE-Antikörper gegen N.b. bildeten (NR).

STRAIN	H-2 HAPLOTYPE	PCA TITERS	
		PRIMARY	SECONDARY
A.TFR 5	AP 5	<10	640
B 10	B	<10	80
A.CA	F	80	2560
B 10.M	F	40	1280
B 10.HTG	G	N.D.	160
B 10.A (2R)	H2	<10	160
B 10.A (4R)	H4	<10	320
CBA/LAC	K	<10	320
B 10.BR	K	<10	80
C ₃ H.OL	O1	<10	320
B 10.G	Q	N.D.	80
A.TH	T2	N.D.	80
B 10.AQR	Y1	<10	160

Tab. 1 b: Der H-2-Haplotyp sowie der maximale PCA-Titer (antigenspezifisches IgE) von 13 Responderstämmen in der Erst- und Zweitinfektion mit N.b.

D.I.1.1.1.1. Die Kinetik der spezifischen IgE-Antwort der Highresponder-Mäuse (HR)

Die Verlaufskurven für die drei HR-Stämme A.CA, B10.M und A.TFR5 sind in Abbildung 9 dargestellt. Die Bestimmung der PCA-Titer im Verlauf der Reinfektion zeigt deutlich den Anstieg der IgE-Produktion bis zum Maximum an Tag 7 nach Zweitinfektion, danach einen kleinen Rückgang auf ein Plateau bis zum 14. Tag und schließlich ein - bei den drei verschiedenen Stämmen auch in etwas unterschiedlicher Intensität eintretender - Abfall der Antikörperproduktion in der dritten Woche nach der Reinfektion.

D.I.1.1.1.2. Die Kinetik der spezifischen IgE-Antwort der Mediumresponder-Mäuse (MR)

Die zeitliche Abhängigkeit der spezifischen IgE-Antwort bei den MR-Mäusen stellt sich in Analogie zu den HR-Mäusen dar: die PCA-Titer der hier (Abb. 10) exemplarisch dargestellten Stämme CBA/Lac, C3H.OL und B10.A (4R) steigen ebenfalls in der ersten Woche nach der Reinfektion bis zum Maximum an, das für diese Mäuse zwischen dem 5. und 10. Tag nach Zweitinfektion liegt; es ist kein deutlicher Gipfelpunkt erkennbar. Schon vom 10. Tag an zeigen diese Mäuse einen steilen Abfall der spezifischen IgE-Produktion und nach zwei Wochen (Tag 14) sind keine spezifischen IgE-Antikörper im Serum nachweisbar. Diese beschriebenen Verlaufskurven gelten auch für die nicht in einer Abbildung dargestellten MR-Stämme B10.HTG, B10.A (2R) und B10.AQR.

D.I.1.1.1.3. Die Kinetik der spezifischen IgE-Antwort der Lowresponder-Mäuse (LR)

Im Gegensatz zu den HR- und MR-Tieren bietet sich bei den vier Mäusestämmen, die als LR-Tiere klassifiziert wurden, kein einheitliches Bild der spezifischen IgE-Antwort (Abb. 11). Allen Stämmen ist gemeinsam, daß die spezifische IgE-Produktion gering ist und einen PCA-Titer von 1 : 80 nicht überschreitet. Bei B10.G-Mäusen wird dieser Wert vom 10. bis 14. Tag nach der Reinfektion erreicht, am 7. bzw. 17. Tag sind aber keine Antikörper nachweisbar. Im Falle der B10-Mäuse erscheint an Tag 5

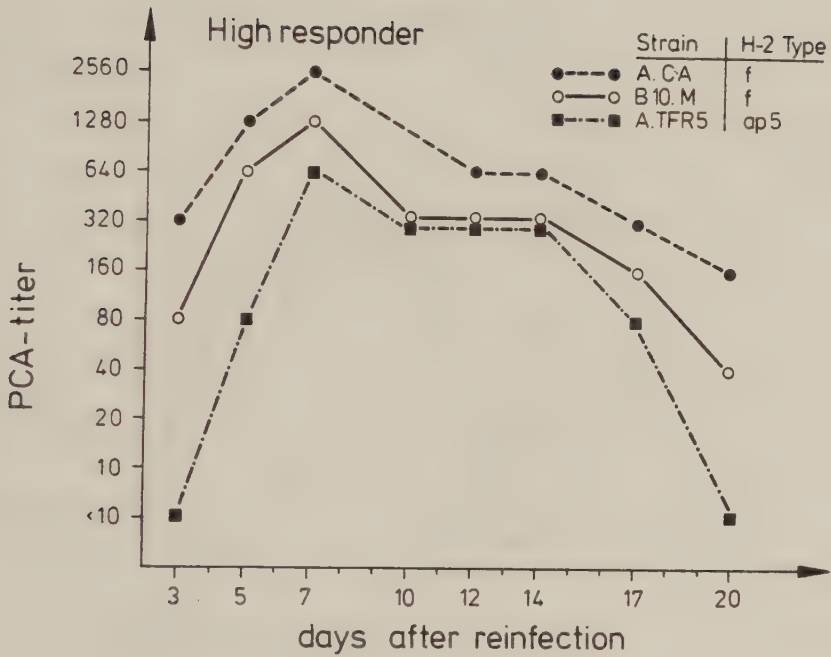


Abb. 9: Kinetik der spezifischen IgE-Antwort der HR-Mäuse nach Zweitinfektion mit N.b.

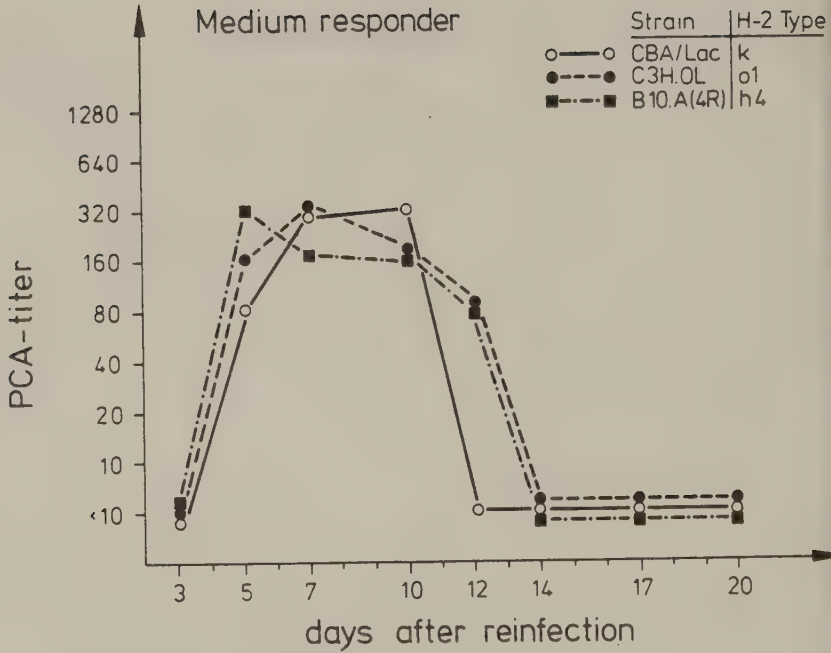


Abb. 10: Kinetik der spezifischen IgE-Antwort von MR-Mäusen nach Zweitinfektion mit N.b.

Low responder

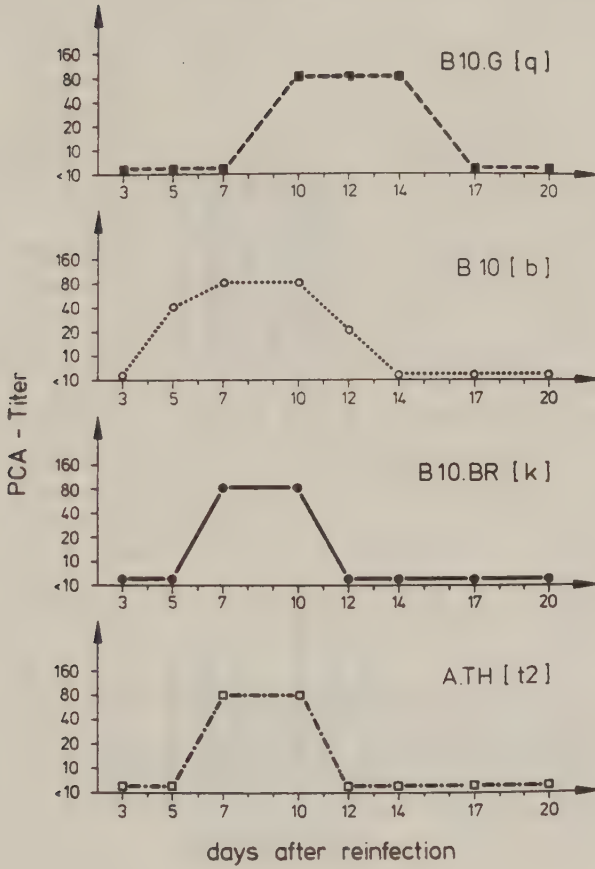


Abb. 11: Kinetik der spezifischen IgE-Antwort der LR-Mäuse nach Reinfektion mit N.b.

eine leichte spezifische Immunantwort (PCA-Titer 1 : 40), die bis zum 12. Tag andauert - mit einem Maximum vom 7. bis 10. Tag. Auch die B10.BR- und ATH-Mäuse erreichen das Maximum ihrer IgE-Antwort vom 7. bis 10. Tag nach Reinfektion; bei ihnen sind aber außer dieser kurzzeitigen Immunantwort keine spezifischen IgE-Antikörper gegen N.b. im Serum nachweisbar.

Die Untersuchung der spezifischen IgE-Antwort ergab, daß es innerhalb der Inzuchtmäuse vier Gruppen gibt, bei denen die Ausprägung einer bestimmten Stärke der Antikörperbildung auch mit dem zeitlichen Verlaufsmuster übereinstimmt. Die NR-Stämme, welche fast zwei Drittel der untersuchten Tiere repräsentieren (23 von 36 Inzuchtstämmen), weisen im Verlauf von Infektion und Reinfektion mit N.b. keine spezifischen Antikörper der IgE-Klasse auf. HR-Mäuse mit hohem PCA-Titer, d. h. mit viel spezifischem IgE, zeigen auch eine große Persistenz der IgE-Antwort, die auch noch drei Wochen nach Reinfektion andauert. Dagegen ist bei allen MR-Tieren nach 14 Tagen kein spezifisches IgE mehr im Serum nachzuweisen. Die Verlaufskurve der mittelhohen IgE-Antwort ist gekennzeichnet durch ein Plateau vom 5. bis 10. Tag nach Reinfektion. Die Gruppe der LR-Stämme mit geringer Antikörperantwort variiert dagegen untereinander auch im zeitlichen Verlauf der IgE-Produktion.

D.I.1.1.1.4. Die Untersuchung von Einzeltieren

Die bisher beschriebenen Experimente zur spezifischen IgE-Antwort bezogen sich auf die Untersuchung von Poolseren: nach der Blutabnahme wurden die gewonnenen Einzelseren jeder Gruppe gemischt und dieser Pool sodann ausgetestet. Im Vergleich dazu werden nun die Ergebnisse dargestellt, die bei der Austestung von Individualseren, d. h. den Seren einzelner Mäuse, erhalten wurden. Parallel zur Einzeltieraustestung wurden Aliquots (0,2 ml) jedes Individualserums einer Gruppe gemischt, so daß auch bei dieser Untersuchung zusätzlich für jede Gruppe ein Poolserum zur Verfügung stand. Die individuelle spezifische IgE-Antikörperantwort wurde für männliche und weibliche Tiere der drei HR-Stämme (A.CA, B10.M, A.TFR5) und des NR-Stammes A.TFR1 bestimmt. In den Abbildungen 12 und 13 sind die PCA-

Specific IgE Response (day 7, 2° N.b. Infection)

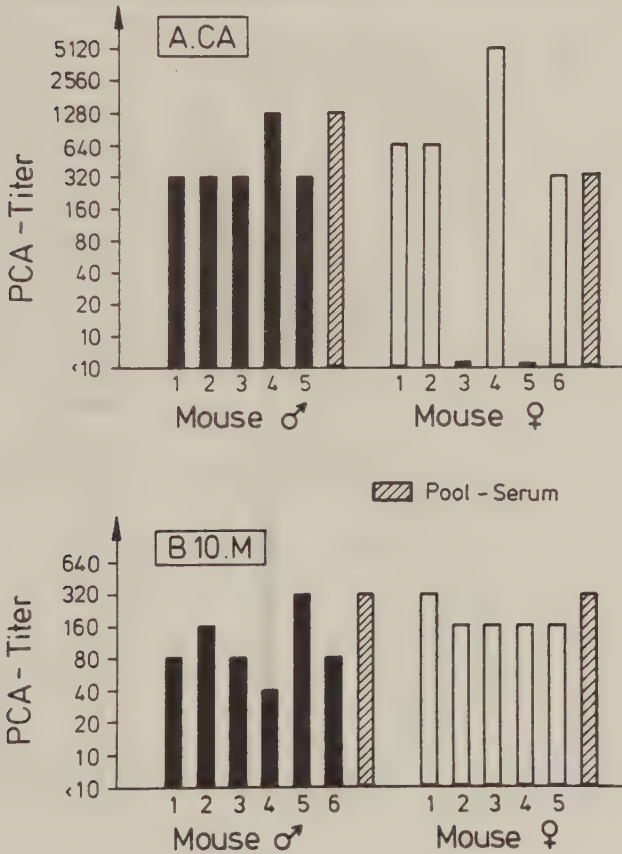


Abb. 12: Die individuelle spezifische IgE-Antikörperbildung gegen N.b. von männlichen und weiblichen A.CA- sowie B10.M-Mäusen (HR) am 7. Tag nach Reinfektion.

Specific IgE Response (day 7, 2° N.b. Infection)

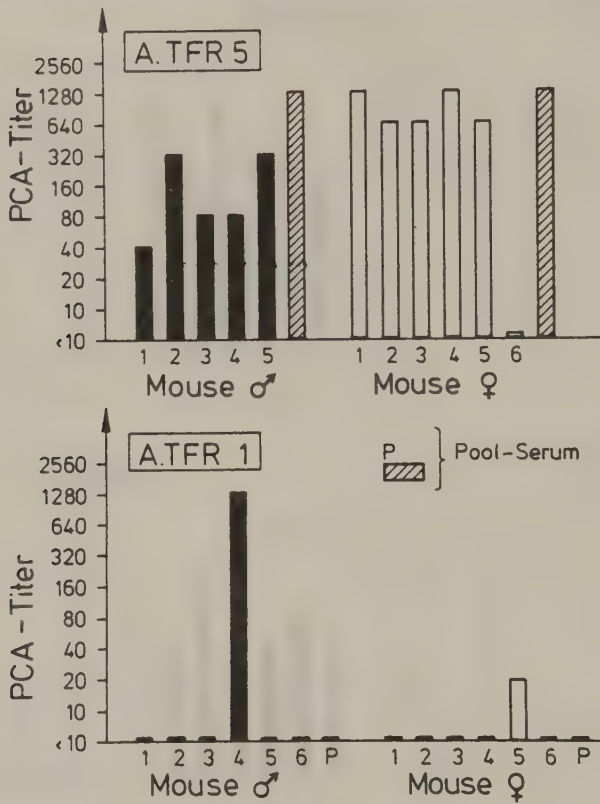


Abb. 13: Die individuelle spezifische IgE-Antikörperbildung gegen N.b. von männlichen und weiblichen A.TFR5 (HR)- bzw. A.TFR1 (NR)-Mäusen am 7. Tag nach Reinfektion.

Titer der individuellen Seren und der im Nachhinein erhaltenen Poolseren am 7. Tag nach der Reinfektion mit N.b. dargestellt. Von den insgesamt 33 untersuchten HR-Mäusen weisen drei (9 %) kein spezifisches IgE im Serum auf. Dafür gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten. Einerseits ist es vorstellbar, daß diese Tiere bei der Infektion oder Reinfektion nicht eine genügend große Anzahl von Larven erhalten haben; ferner ist es durchaus denkbar, daß es auch unter den HR-Mäusen Individuen gibt, die keine spezifischen IgE-Antikörper bilden.

Aus der Darstellung der individuellen PCA-Titer in den Abbildungen 12 und 13 wird deutlich, daß die Produktion von spezifischen Antikörpern in der Menge von Tier zu Tier durchaus unterschiedlich sein kann. Das fällt besonders bei den männlichen Mäusen von B10.M und A.TFR5 auf. Beim Vergleich der PCA-Titer aus den Poolseren mit denen der Individualseren fällt auf, daß der Titer eines Poolserums von dem höchsten Titer eines bzw. der Individualseren einer Gruppe bestimmt zu sein scheint. Bei den männlichen A.TFR5-Mäusen übertrifft der Pooltiter sogar sämtliche Einzelwerte. Das Poolserum der weiblichen A.CA-Tiere ist niedrig; dieses Ergebnis weist auf die Beeinflussung hin, welche die zwei Individuen ohne erkennbare Antikörperproduktion auf den Pool ausüben. Der für diesen Zeitpunkt (7. Tag) der Reinfektion niedrige Titer (1 : 320) der B10.M-Mäuse ist darauf zurückzuführen, daß diese Gruppe der Tiere, die für die Untersuchung der Individualtiter zur Verfügung stand, ein Alter von sechs Monaten aufwies. Somit ist das Ergebnis - was die maximale Ausprägung der spezifischen Antwort betrifft - nicht unbedingt mit dem in Kap. D.1.1.1. beschriebenen zu vergleichen.

Von den 12 untersuchten A.TFR1-Mäusen (NR) weisen zwei (17 %) eine spezifische IgE-Antikörperproduktion auf (PCA-Titer 1 : 1280 bzw. 1 : 20), wobei der hohe Titer bemerkenswert ist. Es scheinen also auch einzelne Mäuse der NR-Gruppe in der Lage zu sein, spezifische IgE-Antikörper gegen N.b. zu bilden. Das konnte allerdings bei der Untersuchung von anderen NR-Mäusen (C3H.SW, Balb/c) nicht bestätigt werden.

D.I.1.1.2. Die Manifestation der Infektion in den Inzucht- mäusen

Es stellte sich natürlich die Frage, worauf die Unterschiede in der Ausprägung der spezifischen IgE-Antwort gegen N.b. bei den verschiedenen Mäusestämmen begründet sein können. Dabei war zu prüfen, ob die Mäuse unterschiedlich auf die Infektion mit dem Nematoden reagierten, d. h. ob Unterschiede in Bezug auf die Empfänglichkeit einer Infektion bestanden. Daher wurden Mäuse verschiedener Respondergruppen mit 750 Larven infiziert und an den Tagen 5 bis 8 nach Infektion je zwei Tiere getötet. Nach Eröffnung der Leibeshöhle und Herauslösen des kleinen Intestinums wurde geprüft, ob dort adulte Würmer nachzuweisen und somit die Infektion erfolgreich verlaufen war. Wie aus Table 2 hervorgeht, war das für alle untersuchten Stämme eindeutig der Fall, wenn auch mit kleinen zeitlichen Unterschieden. Bei High-, Medium-, Low- und Nonrespondern konnten adulte Würmer in größerer Anzahl gefunden werden.

Diese Untersuchungen wurden nicht quantitativ durchgeführt, d. h. die Würmer wurden nicht gezählt. Es sollte angemerkt werden, daß bei den beiden HR-Stämmen mit der größten spezifischen IgE-Produktion (A.CA und B10.M) im Darm eine auffällig größere Zahl von Würmern gefunden werden konnte als bei den anderen Stämmen.

Diese Beobachtung führt zum nächsten Punkt der Untersuchung, dem Zusammenhang zwischen den genetischen Unterschieden der verschiedenen Mäusestämme und der unterschiedlichen spezifischen Antikörperproduktion.

D.I.1.1.3. Die genetische Abhängigkeit der Bildung von spezifischem IgE

D.I.1.1.3.1. Der H-2-Haplotyp und die IgE-Produktion

Wie gezeigt wurde, bestehen keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Inzuchtstämmen hinsichtlich ihrer Ausprägung der N.b.-Infektion, diese war bei allen untersuchten Stämmen erfolgreich (Tab. 2). Da die Produktion von spezifischen IgE-

STRAIN	SPECIFIC IgE- RESPONSIVENESS	DAYS AFTER INFECTION			
		5	6	7	8
A.CA	H	+	+	+	+
A.TFR 5	H	ND	+	+	+
B 10.M	H	+	+	+	ND
C3H.OL	M	ND	+	+	+
B10.A (4R)	M	+	+	+	ND
A.TH	L	ND	+	-	+
B 10	L	+	+	+	ND
B 10.BR	L	ND	+	+	+
B 10.G	L	ND	+	+	+
SJL	N	+	+	+	ND
A.TFR 1	N	ND	+	+	-
C3H/D ₁ SN	N	ND	+	-	+
B 10.D2	N	+	+	+	ND
B 10.A (5R)	N	ND	-	+	+

Tab. 2: Manifestation der N.b.-Infektion in verschiedenen Inzucht-Mäusestämmen.
 +, -: positiver bzw. kein Nachweis von adulten Würmern im Intestinum der Mäuse am 5. - 8. Tag nach Infektion.
 ND: nicht getestet.
 H, M, L, N: Respondertyp bezüglich der spezifischen IgE-Antikörperbildung.

Antikörpern dagegen von Stamm zu Stamm differierte, wurde geprüft, in welchem Maße die genetischen Unterschiede - bestimmt durch den H-2-Haplotyp - der Mäuse in Zusammenhang mit ihrer IgE-Antwort gegen N.b. stehen. In Tabelle 3 sind drei Gruppen von Mäusestämmen zusammengestellt, um die Ergebnisse zu verdeutlichen. Dabei wird für die Lozi des H-2-Komplexes die von Klein (1982) vorgeschlagene Nomenklatur verwendet. Das obere Drittel von Tabelle 3 zeigt die drei HR-Stämme (A.CA, B10.M, A.TFR5) mit einer Auflistung ihrer H-2-Haplotypen. A.CA und B10.M sind Mäuse vom f-Haplotyp und auch A.TFR5-Mäuse mit dem f-Haplotyp im K- bis J-Lokus sind die einzigen HR-Mäuse, charakterisiert durch Höhe und Persistenz der spezifischen IgE-Antwort gegen N.b.

Der einzige Stamm, der noch den f-Haplotyp trägt (A.TFR1: D-Lokus) zeigt dagegen keine spezifische IgE-Antikörperproduktion (vgl. Tab. 1 a, Abb. 13). Daher ist zu folgern, daß ein Ir-Gen (Immune-Response Gen) für N.b. im K- bis J-Lokus lokalisiert ist. Diese Lozi entsprechen der K- und I-Region in der älteren Nomenklatur (vgl. Abb. 5, S. 43). Ir-Gene, die in der I-Region lokalisiert sind, wurden ebenso beschrieben (McDevitt, Deak, Schreffler, Klein, Stimpfling und Snell, 1972) wie Ir-Gene in der K-Region (Zaleski und Klein, 1977; Maron und Cohen, 1979). Im System der Infektion mit N.b. besteht hier eine eindeutige Beziehung zwischen der Ausprägung des f-Haplotyps und einer hohen, antigenspezifischen IgE-Antwort gegen den Parasiten.

Die mittlere Spalte in Tabelle 3 zeigt die Situation von einigen Non-, Low- bzw. Medium-Respondern auf. B10.A (2R) und B10.A (4R) sind Mäuse der MR-Gruppe, ihre Lozi des H-2-Komplexes tragen das k-, b- und d-Allel. Mäuse mit dem d-Haplotyp (B10.D2) gehören zu den Nonrespondern, B10 (H-2^b) und B10.BR (H-2^k) dagegen zur Gruppe der LR-Tiere. So besteht die Möglichkeit, daß die Kombination von Allelen, deren Ausprägung eine schwache oder keine IgE-Antwort induziert, in diesem Falle zu einer mittelhohen spezifischen IgE-Antikörperproduktion führt.

STRAIN	PCA - TITER	PARENTAL H-2 HAPLOTYPES	H-2 HAPLOTYPE	K	A ₂	A _β	E _β	J	E _κ	S	D
A.CA	2560		F	F	F	F	F	F	F	F	F
B 10.M	1280		F	F	F	F	F	F	F	F	F
A.TFR 5	640	F / T 1	AP 5	F	F	F	F	F	F	K	D
B 10	80		B	B	B	B	B	B	B	B	B
B 10.D2	<10		D	D	D	D	D	D	D	D	D
B 10.BR	80		K	K	K	K	K	K	K	K	K
B 10.A(2R)	160	A / B	H 2	K	K	K	K	K	K	D	B
B 10.A(4R)	320	A / B	H 4	K	K	K	K	B	B	B	B
CBA /LAC	320		K	K	K	K	K	K	K	K	K
AKR /CU	<10		K	K	K	K	K	K	K	K	K
C 3H/DISN	<10		K	K	K	K	K	K	K	K	K
B 10.BR	80		K	K	K	K	K	K	K	K	K

Tab. 3: Die spezifische IgE-Antikörperproduktion von Inzuchtmäusen in Abhängigkeit ihres H-2-Haplotyps.

K - D: Lozi des H-2-Komplexes auf den Chromosomen 17 der Maus (Nomenklatur nach Klein, 1982).

Im unteren Drittel von Tabelle 3 wird verdeutlicht, daß eine weitere genetische Kontrolle der IgE-Antwort gegen N.b., außerhalb des H-2-Komplexes lokalisiert, nicht auszuschließen ist. Alle vier dargestellten Stämme sind im H-2-Haplotyp absolut identisch, gehören aber unterschiedlichen Respondergruppen an: CBA/Lac ist ein MR, B10.BR ein LR, AKR/CU und C3H/DiSn gehören zu den NR-Mäusen.

Weitere Vergleiche der untersuchten Mäusestämme mit ihrem H-2-Haplotyp und der spezifischen IgE-Antwort ergaben keine eindeutigen Zusammenhänge. So sind alle H-2^b-Mäuse (C57BL/6, A.BY, C3H.SW) Nonresponder und auch die Rekombinanten B10.A (3R) und B10.A (5R) mit dem b-Haplotyp vom K- bis J-Lokus zeigen keine Immunantwort gegen N.b. Als Ausnahme gehört der Stamm B10 (H-2^b) zu der Gruppe von LR-Tieren.

Ebenso sind alle H-2^S-Mäuse (SJL, A.SW, B10.S (7R), B10.HTT, B10.S (9R)) Nonresponder, aber auch hier gibt es mit dem LR-Stamm A.TH (H-2^S) eine Ausnahme. Weiterhin gehört auch A.TFR1 mit dem s-Haplotyp im K-Lokus zu den NR-Stämmen (Tab. 1 a, S. 76).

Es muß also festgestellt werden, daß genetisch determinierte Unterschiede bei der spezifischen IgE-Antwort gegen N.b. bestehen, diese aber einer weiteren Klärung bedürfen. Dazu gehören zweifellos Kreuzungs- und Rückkreuzungsexperimente, um diese Problemstellung weiter zu erarbeiten.

D.I.1.1.3.2. Die IgE-Antwort von F1-Hybridmäusen

Im Anschluß an die Austestung der verschiedenen Inzuchtstämme wurden auch zwei Kreuzungsexperimente durchgeführt. Balb/c-NR-Mäuse (H-2^d) wurden mit A.CA- und B10.M-Tieren (beide HR: H-2^f) gekreuzt. Nachkommen der F1-Generation wurden dann dem beschriebenen Infektionsschema (Abb. 8) unterworfen und ihre spezifische IgE-Antikörperproduktion am 5., 7. und 10. Tag nach Reinfektion individuell und als Poolseren bestimmt. Es wurden also (A.CA x Balb/c) F1-Mäuse und (B10.M x Balb/c) F1-Mäuse getestet. So sollten erste Hinweise erhalten werden, welchem Erbgang die IgE-Antikörperantwort gegen N.b. unterliegt. In Tabelle 4 sind die PCA-Titer der individuell unter-

(A.CA x BALB / c) F1 -HYBRID - MICE : SPECIFIC IgE RESPONSE (PCA - TITER) TOWARDS N.B.									
♂ MOUSE - NO.	DAYS AFTER REINFECTION			♀ MOUSE - NO.	DAYS AFTER REINFECTION				
	5	7	10		5	7	10		
1	-	-	-	1	-	160	160		
2	80	80	320	2	-	-	-		
3	-	-	-	3	-	-	-		
4	-	-	-	4	-	-	-		
5	320	40	160	POOL 1-4	-	-	-		
6	320	80	320		-	-	-		
POOL 1-6	80	40	-						
7	160	640	320	5	80	320	80		
8	-	-	-	6	160	1280	320		
9	160	1280	320	7	-	-	320		
10	160	1280	320	8	-	-	320		
11	-	-	320	9	-	40	320		
12	-	-	-	10	80	640	1280		
POOL 7-12	160	80	80	POOL 5-10	40	320	640		
- = NO IgE DETECTED									

Tab. 4: Die spezifische IgE-Antikörperbildung in der F1-Generation aus der Kreuzung zwischen A.CA (HR)- und Balb/c (NR)-Mäusen. Individual- und Pooltiter am 5., 7. und 10. Tag nach Rein-
fektion mit N.b.

suchten Tiere und der pro Versuchsgruppe gebildeten Pools von (A.CA x Balb/c) F1-Tieren dargestellt. Es fällt der hohe Prozentsatz (36 %, d. h. 8 von 22 Mäusen) von Individuen auf, die keine IgE-Antikörper produzieren; zusätzlich erscheint bei drei Tieren (= 14 %) die Antikörperbildung erst am 10. Tag nach der Reinfektion. Nur insgesamt fünf Mäuse (23 %) zeigen das Bild einer hohen Immunantwort (HR). Sieben Tiere sind dem Typ eines Lowresponders zuzuordnen.

Die Untersuchung der Poolseren zeigt, daß bei dieser F1-Generation die spezifische IgE-Produktion dem Bild von LR- oder MR-Mäusen ähnelt, von einer HR-Gruppe dagegen nicht gesprochen werden kann. Dabei ist bei der Bewertung der Poolseren die große Anzahl von Tieren zu berücksichtigen, die keine antigenspezifischen IgE-Antikörper produzieren. Das ist auf den Pool-Titer nicht ohne Einfluß, zeigt aber ebenso, daß in der F1-Generation von (A.CA x Balb/c)-Mäusen nicht von einer HR-Antwort bezüglich der spezifischen IgE-Bildung gesprochen werden kann.

Ein ähnliches Resultat zeigt sich für (B10.M x Balb/c) F1-Hybridmäuse (Tab. 5). Hier produzieren 5 von 25 getesteten Tieren (= 20 %) keine IgE-Antikörper, bei zwei Mäusen (= 8 %) werden erst am 10. Tag nach Reinfektion Antikörper gebildet. Nur sechs Tiere (= 24 %) entsprechen dem HR-Typ. Fast die Hälfte der Mäuse (48 %) entspricht auch in diesen Gruppen dem Typ der LR- bzw. MR-Tiere. Dies gilt auch für die Poolseren.

Die beschriebenen Kreuzungsexperimente deuten also darauf hin, daß bezüglich der spezifischen IgE-Antikörperantwort gegen N.b. ein intermediärer Erbgang vorliegt. Um diese genetischen Vorgänge aber restlos zu klären, müßten weitere Kreuzungsversuche mit anderen Stamm- und Responderkombinationen bzw. Rückkreuzungsexperimente durchgeführt werden. Solche Untersuchungen wurden nicht weiter verfolgt. Die beschriebenen Ergebnisse ermöglichen schon an diesem Punkt einen Verzicht auf die Vertiefung der genetischen Fragestellung. Die Unterschiede zwischen den Mäusestämmen hinsichtlich der Bildung von spezifischen IgE-Antikörpern gegen N.b. lieferten eine gute Grundlage zur Durchführung von Versuchen zur Modulation dieser IgE-Produktion.

(B 10.M x BALB / c) F1 - HYBRID - MICE : SPECIFIC IgE RESPONSE (PCA - TITER) TOWARDS N.B.									
♂ Mouse - No.	DAYS AFTER REINFECTION			♀ Mouse - No.	DAYS AFTER REINFECTION			POOL	TITER
	5	7	10		5	7	10		
1	20	-	-	1	160	320	320	320	320
2	320	320	320	2	-	-	-	640	640
3	-	-	-	3	320	640	160	320	320
4	-	160	80	4	160	320	320	1280	160
5	80	80	160	5	320	2560	640	320	320
6	80	160	160	6	320	640	320	320	320
POOL 1-6	40	80	80	7	320	640	320	320	320
7	80	640	40	POOL 1-7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	8	-	-	-	640	640
9	40	320	-	9	80	160	160	40	40
10	320	2560	640	10	-	-	-	20	320
11	-	-	320	11	-	160	160	160	160
12	160	1280	160	12	-	20	20	320	320
POOL 7-12	160	640	320	13	160	160	160	80	320
				POOL 8-13	160	160	160	80	320

- = NO IgE DETECTED

D.I.1.2. Die Modulation der spezifischen IgE-Antwort durch Mäuseseren

Die genetisch determinierten Unterschiede bei der spezifischen IgE-Antwort, dargestellt im vorausgehenden Kapitel, führten zu der weiteren Fragestellung, inwieweit die IgE-Antikörperantwort gegen N.b. beeinflussbar ist und in welchem Maße Regulationsmechanismen auf humoraler oder zellulärer Ebene bestehen. In dem Modell der Infektion von Mäusen mit N.b. wurde daher untersucht, ob die spezifische IgE-Produktion in vivo unter dem Einfluß verschiedener Mäuseseren verändert werden kann, wie es in einem anderen System gezeigt werden konnte (Katz und Tung, 1978; Tung, Chiorazzi und Katz, 1978; Katz und Tung, 1979).

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden HR-Mäuse vor der Infektion und Reinfektion mit Seren von nicht N.b.-infizierten LR- bzw. NR-Mäusen behandelt. Das Versuchsprotokoll ist in Abbildung 14 dargestellt. Es wurden jeweils Gruppen von je fünf Tieren untersucht. Die Mäuse der Gruppen IV bis VI wurden acht Tage vor der Infektion mit 750 Larven einer sublethalen Röntgenbestrahlung (150 R) unterzogen, während die Gruppen I bis III nicht vorbehandelt wurden. Danach erhielten die Tiere - beginnend einen Tag vor der N.b.-Infektion (day -1) - viermal eine Injektion von 1 : 5 verdünnten (in 0,9 % NaCl) normalen Mäuseserums (0,5 ml) oder CFA-Immunserums (vgl. Kap. C.II.3:) oder Puffers (0,9 % NaCl) in 12-stündigen Intervallen, wechselweise intravenös und intraperitoneal. Zusammen mit der dritten Seruminjektion wurden die Mäuse mit 750 Larven N.b. subcutan infiziert und dann am Tag 28 mit der gleichen Dosis reinfiziert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Tiere dann geblutet und die Poolseren in der PCA-Reaktion auf die spezifische IgE-Antikörperproduktion untersucht.

D.I.1.2.1. Der Einfluß von NR-Serum auf HR-Mäuse

Die spezifische IgE-Antikörperproduktion von A.TFR5-HR-Mäusen (Tab. 6) wird durch Behandlung der Tiere mit A.TFR1-NR-Serum bzw. A.TFR1-NR-CFA-Serum deutlich gesteigert. Die PCA-Titer der unbehandelten Kontrollgruppen (Gruppe I, 1 : 320 - 1 : 1280)

Serum-Mediated Modulation of IgE antibody response towards *Nippostrongylus brasiliensis*

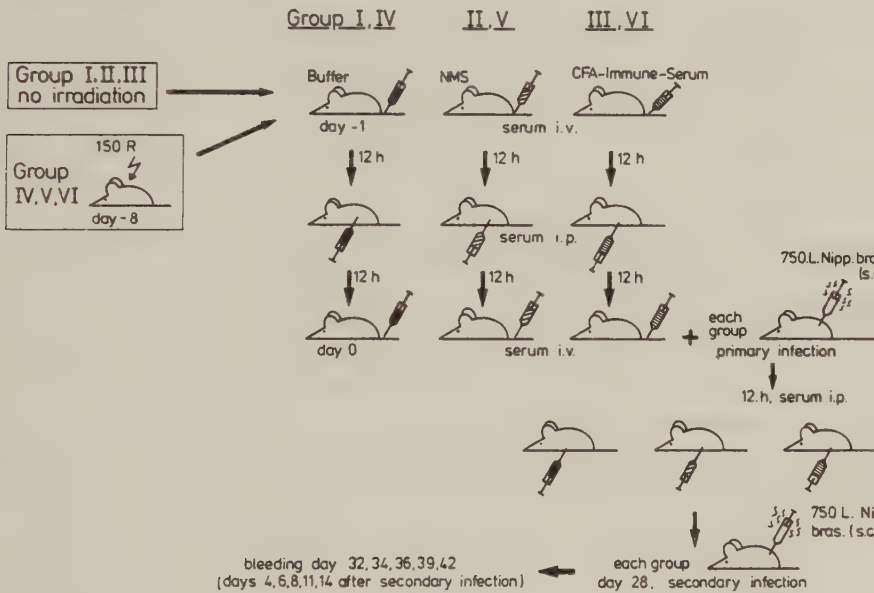


Abb. 14: Versuchsprotokoll der Experimente zur Modulation der spezifischen IgE-Antwort in vivo durch Mäuseserum.

GROUP	PRE-TREATMENT (DAY -8)	SERUM TREATMENT (DAYS -1,0)	INFECTION WITH 750 LARVAE H.B. (DAY 0) (DAY 28)		IGE ANTI-Nb ANTIBODY RESPONSE (PCA-TITERS) (DAYS AFTER REINFECTION)				
					4	6	8	11	14
A.TFR 5-MICE I II III IV V VI	NONE	NONE	+	+	0	320	640	1280	640
		A.TFR 1 NORMAL SERUM	+	+	40	320	2560	1280	320
		A.TFR 1 CFA SERUM	+	+	80	320	10240	5120	640
	150 R	NONE	+	+	0	320	40	0	0
		A.TFR 1 NORMAL SERUM	+	+	40	320	1280	640	160
		A.TFR 1 CFA SERUM	+	+	40	320	1280	640	160

Tab. 6: Die Modulation der antigenspezifischen IgE-Antwort von A.TFR5-Mäusen (HR) durch Behandlung mit NR-Serum (A.TFR1).

GROUP	PRE-TREATMENT (DAY -8)	SERUM TREATMENT (DAYS -1,0)	INFECTION WITH 750 LARVAE H.B. (DAY 0) (DAY 28)		IGE ANTI-Nb ANTIBODY RESPONSE (PCA-TITERS) (DAYS AFTER REINFECTION)				
					4	6	8	11	14
B.10.M-MICE I II III IV V VI	NONE	NONE	+	+	80	640	1280	320	320
		B.10.G NORMAL SERUM	+	+	160	640	640	320	160
		B.10.G CFA SERUM	+	+	160	320	320	160	160
	150 R	NONE	+	+	320	2560	2560	2560	640
		B.10.G NORMAL SERUM	+	+	0	640	160	160	320
		B.10.G CFA SERUM	+	+	80	320	160	20	30

Tab. 7: Die Modulation der antigenspezifischen IgE-Antwort von B10.M-Mäusen (HR) durch Behandlung mit LR-Serum (B10.G).

steigen auf 1 : 2560 (Gruppe II) bzw. 1 : 10 240 (Gruppe III). Die Gabe von NR-Serum führt bei den HR-Mäusen zu einer deutlichen Verstärkung der spezifischen IgE-Produktion. Dieser Effekt wird bestätigt bei den bestrahlten Tiergruppen. Die sublethale Röntgenbestrahlung führte zu einer massiven Unterdrückung der IgE-Antwort bei der nicht mit Serum behandelten Kontrollgruppe (IV). Dieser Effekt der Bestrahlung wird nun durch die Behandlung der Tiere mit NR-Serum bzw. NR-CFA-Serum wieder aufgehoben, die PCA-Titer steigen wieder auf die Normalwerte (vgl. Kontrollgruppe I) von 1 : 320 - 1 : 1280 an.

D.I.1.2.2. Der Einfluß von LR-Serum auf HR-Mäuse

In dieser Versuchsreihe wurden B10.M-HR-Mäuse mit Serum von LR-Mäusen (B10.G) behandelt und dabei die folgenden Resultate beobachtet (Tab. 7). Im Vergleich zur Kontrollgruppe (I), reduziert die Serumbehandlung mit LR-Serum die spezifische IgE-Antwort leicht (der PCA-Titer am Tag 8 nach Reinfektion, d. h. im Maximum, verringert sich von 1 : 1280 auf 1 : 640 (Gruppe II)). Dieser Effekt wird etwas deutlicher bei Verwendung von CFA-Immunserum, welches eine Minderung der spezifischen IgE-Antikörper auf einen Titer von 1 : 320 bewirkt (Gruppe III). Im Gegensatz zu den A.TFR5-Mäusen induzierte die sublethale Röntgenbestrahlung der B10.M-Tiere eine Steigerung der IgE-Produktion (Gruppe IV: Anstieg des PCA-Titers auf 1 : 2560 schon an Tag 6 und Persistenz dieses Titers bis Tag 11 nach Reinfektion). Die Behandlung von bestrahlten HR-Mäusen dieses Stammes mit B10.G-LR-Serum bzw. -CFA-Serum führt zu einer deutlichen Suppression dieser hohen IgE-Produktion (Gruppe V, VI: Abfall der PCA-Titer auf 1 : 160 bzw. 1 : 20).

In beiden Versuchsreihen wird die modulierende Wirkung von verschiedenen Mäuseseren deutlich, wenn auch unterschiedliche Effekte auftreten. Die Tatsache, daß die spezifische IgE-Antikörperproduktion durch Mäuseseren beeinflusst werden kann, führte zwangsläufig zu der Fragestellung, ob und in welcher Weise definierte Serumfaktoren dafür verantwortlich sein können. Es wurden daher Versuche zu diesem Fragenkomplex konzipiert, über die in späteren Kapiteln berichtet wird.

D.I.1.3. Kurzzusammenfassung: antigenspezifische IgE-Produktion

Bei der Untersuchung der spezifischen IgE-Antikörperantwort gegen N.b. von Inzuchtmäusen wurde festgestellt, daß eine genetische Kontrolle der spezifischen IgE-Antwort nach Reinfektion durch den H-2-Komplex stattfindet (H-2^f-Mäuse sind High-Responder, Ir-Gen für N.b.). Es gibt verschiedene Respondergruppen, die sich voneinander in Höhe und Kinetik der spezifischen IgE-Bildung unterscheiden. Dagegen findet sich bei allen Mäusestämmen, auch den NR-Tieren, eine positive Empfänglichkeit der Infektion mit N.b. Die Produktion des spezifischen IgE kann durch Behandlung der HR-Mäuse mit Seren von LR- bzw. NR-Mäusen moduliert werden.

D.I.2. Studien über die totale IgE-Produktion

D.I.2.1. Die Produktion von IgE im Infektionszyklus

Die Generierung von monoklonalem Mäuse-IgE (Bohn und König, 1982 a, b) war die grundlegende Voraussetzung, um nach Anreicherung des anti-IgE (Kap. C.II.8.) einen quantitativen RIA zur Bestimmung des totalen IgE im Serum von Mäusen zu etablieren (vgl. Kap. C.II.10.1.). Auf diese Weise konnte die große Anzahl von Mäusen der verschiedenen Inzuchtstämme neben der spezifischen IgE-Antwort gegen N.b. auch auf ihre totale IgE-Produktion, d. h. die antigenunspezifische IgE-Antwort, untersucht werden. Die bei der Gewinnung schon 1 : 10 verdünnten Mäuseseren (vgl. Kap. C.II.2.) mußten in der Regel nochmals 1 : 160 in 0,9 %iger NaCl-Lösung weiter verdünnt werden, die Endverdünnung war somit 1 : 1600, um im linearen Meßbereich des RIA zu liegen. Das Ziel der Untersuchungen bestand darin, den Verlauf und die Ausprägung der totalen IgE-Produktion während der N.b.-Infektion zu erfassen und mit der spezifischen IgE-Antwort zu vergleichen. Wie schon dargelegt worden ist (Kap. D.I.1.1.1.), wurden die Mäusestämme hinsichtlich ihrer spezifischen IgE-Produktion in Responder-Gruppen unterteilt. Diese Klassifizierung bzw. Bezeichnungen werden in allen weiteren Experimenten beibehalten, beziehen sich allerdings nur auf die spezifische IgE-Antwort der Mäuse.

D.I.2.1.1. Die IgE-Produktion nicht N.b.-infizierter Mäuse

Ausgangspunkt für die Darstellung der absoluten IgE-Produktion im Verlauf der Infektion und Reinfektion von Mäusen mit N.b. war eine Untersuchung der Tiere vor der ersten Infektion, d. h. von völlig unbehandelten Mäusen. In Tabelle 8 sind die Werte des im Serum gemessenen totalen IgE-Spiegels von nicht infizierten Mäusen aufgelistet. Es handelt sich hier wiederum um Pool-Seren; die Mäusestämme sind analog ihrer spezifischen IgE-Antwort gegen N.b. in die vier Respondergruppen eingeteilt. Auffällig ist der relativ hohe IgE-Gehalt in allen Seren, der von 229 ng/ml (B10.M) bis 539 ng/ml (SJL) variiert.

Betrachtet man die Mittelwerte der vier Gruppen, so scheint ein Anstieg der totalen IgE-Produktion von den HR-Tieren (303 ng), über MR- (331 ng), LR- (336 ng) bis zu den NR-Mäusen (412 ng) vorzuliegen, der genau entgegengesetzt der Produktion von spezifischem IgE dieser Tiere nach Reinfektion von N.b. verläuft. Bei einer Interpretation dieses Ergebnisses muß jedoch der unterschiedliche Umfang der Stichproben berücksichtigt werden: es wurden je drei Stämme der HR-, MR- und LR-Tiere untersucht, aber acht NR-Stämme. Auch zeigt sich eine große Schwankungsbreite der Werte innerhalb der Gruppen. So liegt die Standardabweichung der Werte von den HR-Gruppen bei 25 % und die der NR-Tiere bei 17 %; eine statistische Absicherung der vier Gruppenwerte untereinander konnte nicht nachgewiesen werden. Es fällt jedoch auf, daß fast alle NR-Stämme (mit Ausnahme von C57Bl/6) einen höheren IgE-Level im Serum aufweisen als die Stämme der anderen Respondergruppen; nur A.CA (379 ng/ml) und A.TH (402 ng/ml) liegen im gleichen Bereich wie die NR-Tiere. Bildet man den Mittelwert aller neun untersuchten Respondergruppen ($\bar{x} = 323 \pm 51$ ng/ml) und vergleicht ihn mit dem der NR-Tiere (412 ± 68 ng/ml), wird deutlich, daß im Serum unbehandelter NR-Mäuse mehr IgE nachzuweisen ist als in dem derjenigen Tiere, die nach der Reinfektion mit N.b. durch die Bildung von spezifischem IgE auffallen.

STRAIN	TOTAL IGE (NG/ML)	RESPONDERGROUP
A.CA A.TFR 5 B 10.M	379 301 229 $\bar{x} 303 \pm 75$	HIGH
C ₃ H.OL B 10.HTG B 10.AQR	353 324 315 $\bar{x} 331 \pm 20$	MEDIUM
A.TH B 10 B 10.G	402 312 293 $\bar{x} 336 \pm 58$	LOW
C57BL/6 BALB/cJ SJL A.TL A.TFR 1 C ₃ H/D1SN B 10.A B 10.A (5R)	312 383 539 451 407 427 353 424 $\bar{x} 412 \pm 68$	NON

Tab. 8: Serum-IgE-Spiegel (ng/ml) nicht infizierter
Inzucht-Mäusestämme.

D.I.2.1.2. Der Verlauf der totalen IgE-Produktion im Infektionszyklus

Die totale IgE-Produktion im Verlauf der Infektion und Reinfektion mit N.b. wurde bei den drei HR-Stämmen (A.CA, B10.M, A.TFR5) und je einem repräsentativen Stamm der MR- (C3H.OL), LR- (B10.G) und NR-Mäuse (A.TFR1) untersucht. Die Tiere wurden am 14. Tag der Erst- und an den Tagen 5, 10, 15 der Reinfektion geblutet und der IgE-Gehalt im Serum bestimmt. Bei allen Mäusen kommt es nach der Infektion zu einem außerordentlich starken Anstieg des IgE im Serum (Tab. 9). Die Werte erreichen das 20- bis 30-fache des IgE-Gehaltes im Serum nicht infizierter Mäuse. So steigt der IgE-Spiegel von B10.G-Mäusen (LR) von 0,29 µg/ml auf 7,0 µg/ml (Faktor 24,1), bei B10.M-Tieren (HR) von 0,23 µg/ml auf 7,3 µg/ml an (Faktor 31,7). Die Serumwerte des totalen IgE steigen dann nach der Reinfektion noch einmal um fast das Doppelte an; das wird beim Vergleich der Werte des 14. Infektionstages mit denen am 10. Tag nach Zweitinfektion deutlich. Zu diesem Zeitpunkt wird die maximale IgE-Produktion bei allen Stämmen erreicht. Die Zunahme ist bei den A.TFR1-Mäusen weniger stark: von 9,8 µg/ml (14. Tag Infektion) steigt der Wert auf 12,9 µg/ml in der Reinfektion. Aber auch bei diesen Mäusen erreicht das Serum-IgE am 10. Tag nach Reinfektion den maximalen Wert. Zwei Wochen nach der Zweitinfektion (Tag 15) ist ein deutlicher Abfall der IgE-Werte erkennbar.

D.I.2.1.3. Die Kinetik der totalen IgE-Produktion in der Reinfektion

In Analogie zur Bildung des spezifischen IgE wurde auch die Kinetik der totalen IgE-Produktion im Verlauf der Reinfektion verschiedener Mäuse untersucht.

D.I.2.1.3.1. Highresponder-Mäuse

Abbildung 15 zeigt den zeitlichen Verlauf der totalen IgE-Produktion im Serum der drei HR-Stämme. Die Kurven verlaufen für die drei Stämme parallel: Anstieg auf das Maximum an den Tagen 8 bis 10 nach Reinfektion - bei den A.TFR5-Mäusen tritt eine

	TOTAL SERUM-IGE (µg/ML)				
	NON-INFECTED	DAY 14 (PRIMARY INFECTION)	DAY 5 (SECONDARY INFECTION)	DAY 10 (SECONDARY INFECTION)	DAY 15 (SECONDARY INFECTION)
A. CA	0,38	10,3	13,4	18,8	17,1
B 10. M	0,23	7,3	11,1	16,8	11,9
A. TFR 5	0,30	N. D.	9,3	12,6	10,0
(HIGH-RESPONDER)					
C ₂ H ₂ OL	0,35	9,4	11,5	17,2	10,9
(MEDIUM-RESPONDER)					
B 10. G	0,29	7,0	7,4	12,0	8,1
(LOW-RESPONDER)					
A. TFR 1	0,41	9,8	9,7	12,9	9,4
(NON-RESPONDER)					

Tab. 9: Die totale IgE-Produktion (µg/ml) im Infektionsverlauf mit
N.b. bei verschiedenen Mäusestämmen.

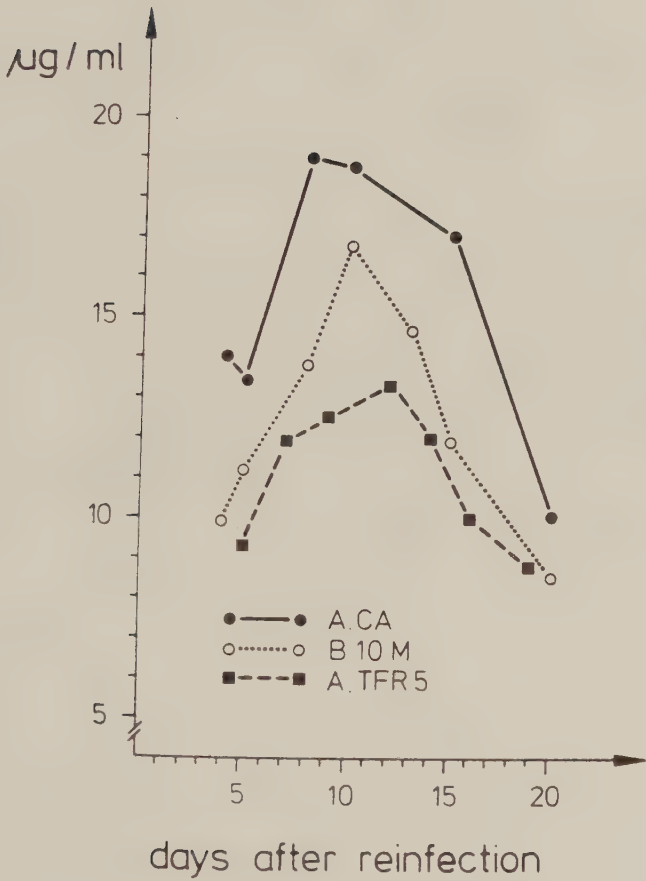


Abb. 15: Die Kinetik der totalen IgE-Bildung der HR-Mäuse nach Reinfektion mit N.b.

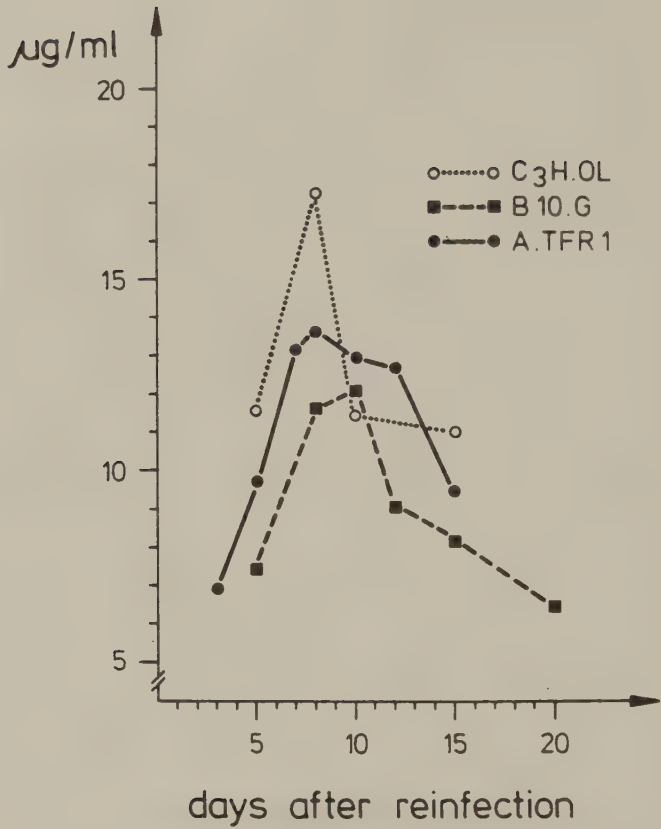


Abb. 16: Die Kinetik der totalen IgE-Produktion nach Reinfektion mit N.b. am Beispiel eines MR (C3H.OL), LR (B10.G) und NR (A.TFR1).

leichte Maximumverschiebung zum Tag 12 auf - und dann ein Abfall der Werte am 20. Tag auf den Ausgangslevel. Bei den A.CA-Mäusen ist der IgE-Gehalt am größten; das Maximum persistiert vom 8. bis 10. Tag; dagegen ist bei B10.M ein klarer Gipfel-punkt am 10. Tag zu erkennen.

D.I.2.1.3.2. Andere Respondergruppen

Von den anderen drei Respondergruppen wurde je ein repräsentativer Stamm untersucht und die Kinetik in Abbildung 16 dargestellt. Die totale IgE-Produktion der Stämme unterscheidet sich, wie schon bei den HR-Mäusen gezeigt, in der absoluten Höhe. Der MR-Stamm C3H.0L weist deutlich den größten Wert auf, die NR-Mäuse A.TFR1 produzieren im gesamten Verlauf nach Reinfektion mehr IgE als die LR-Tiere B10.G. Während bei dem letztgenannten Stamm das Maximum vom 8. zum 10. Tag nach Reinfektion auftritt, zeigt sich bei A.TFR1-Mäusen ein Plateau vom 7. bis 12. Tag nach Zweitinfektion; das Maximum der IgE-Bildung ist ähnlich herausgezogen wie bei den A.TFR5-Mäusen (Abb. 15).

D.I.2.1.4. Die totale IgE-Produktion beim Vergleich der Respondergruppen

Die Mittelwerte der totalen IgE-Produktion jeder Respondergruppe sind in Abbildung 17 dargestellt. Analog zu Tabelle 8 (totales IgE im Serum nicht infizierter Mäuse) handelt es sich um die drei HR-Stämme, je drei MR- und LR-Stämme sowie den Mittelwert der untersuchten acht NR-Mäusestämme. In dieser Darstellung wird deutlich, daß sich die totale IgE-Produktion in den vier verschiedenen Respondergruppen - die bezüglich der spezifischen IgE-Produktion gebildet worden waren - nicht wesentlich unterscheidet. Zwar sind die Mittelwerte der HR-Stämme am 5. und 10. Tag nach Reinfektion gegenüber denen der anderen Gruppen leicht erhöht, es liegen aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Respondertypen bezüglich des totalen IgE vor.

So wird deutlich, daß keine Übereinstimmung bei den verschiedenen Mäusestämmen hinsichtlich der Bildung von antigenspezifischem IgE und der totalen IgE-Produktion besteht.

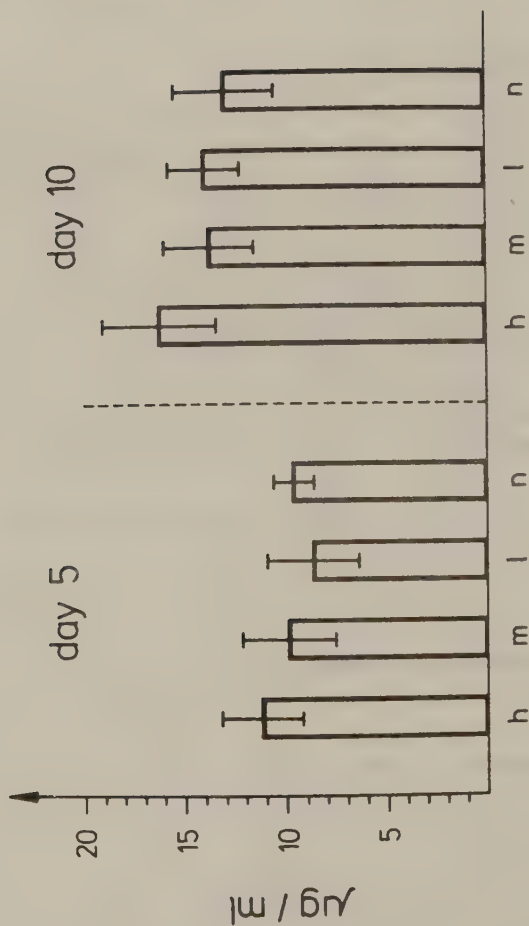


Abb. 17: Mittelwerte der totalen IgE-Produktion am 5. und 10. Tag nach

Reinfektion mit N.b.

h, m, l, n: HR, MR, LR, NR.

Es wurden die gleichen Mäusestämme wie in Tab. 8 (S. 100) getestet.

D.I.2.2. Die Untersuchung von Einzeltieren

D.I.2.2.1. Individualtiter und Geschlechtsspezifität

Wie schon bei der Bestimmung des spezifischen IgE im Serum, so wurde auch bei der totalen IgE-Produktion untersucht, ob es individuelle oder geschlechtsspezifische Unterschiede innerhalb der Mäuse gibt. Es wurden die Einzelseren und nachträglich gebildeten Poolseren (in Analogie zu Kap. D.I.1.1.1.4.) von HR- und NR-Mäusen geprüft. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse der männlichen und weiblichen A.CA- und B10.M-Mäuse, in Abbildung 19 die der A.TFR5-HR- und A.TFR1-NR-Tiere am 7. Tag nach Reinfektion dargestellt. Es zeigt sich eindeutig, daß keine geschlechtsspezifischen Unterschiede innerhalb eines Stammes bestehen. Die Werte der Poolseren von männlichen und weiblichen Tiere unterscheiden sich nicht. Innerhalb der untersuchten Gruppen sind Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen erkennbar, die aber den Rahmen der bei biologischen Systemen auftretenden Schwankungen nicht überschreiten. Die Abweichungen vom Mittelwert liegen bei 10 %; nur die Werte der weiblichen A.TFR1-Mäuse streuen 20 % um den Mittelwert und auch bei B10.M-Tieren zeigt sich eine Abweichung von 15 % bzw. 17 %.

D.I.2.2.2. Vergleich von Poolseren mit den Mittelwerten von Individualseren

Durch die quantitative Bestimmung des Serum-IgE wurde es ermöglicht, einen absoluten Vergleich zwischen den individuellen Werten einer Gruppe und dem IgE-Gehalt des Poolserums der gleichen Gruppe herzustellen. So wurde nach der Bestimmung des IgE im Serum jeder einzelnen Maus einer Gruppe - durchgeführt mit Hilfe des RIA - rechnerisch der Mittelwert dieser Einzeldaten gebildet. Dieser Mittelwert wurde dann mit dem IgE-Gehalt des Poolserums der gleichen Tiergruppe, bestimmt im RIA, verglichen. Das Ergebnis für die drei HR-Stämme, die vier MR-Stämme und zwei der NR-Stämme ist in Tabelle 10 dargestellt. Die IgE-Produktion der nach Geschlechtern getrennt untersuchten Mäuse ist am 7. Tag nach Reinfektion bestimmt worden. Neben

Total IgE Response (day 7, 2° N.b.- Infection)

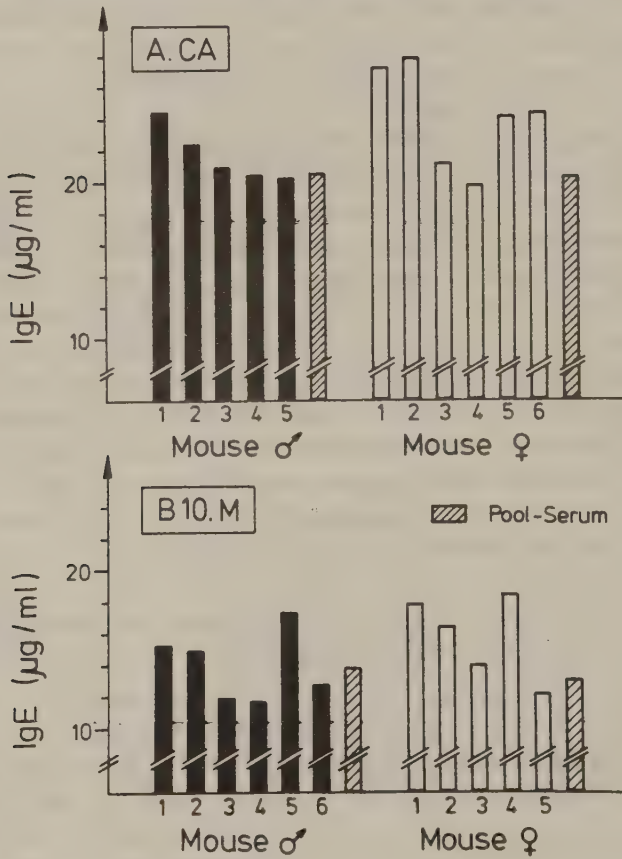


Abb. 18: Die Individualtiter (µg/ml) - totales IgE - von männlichen und weiblichen HR-Mäusen (A.CA, B10.M) am 7. Tag nach Reinfektion.

Total IgE Response (day 7, 2° N.b.-Infection)

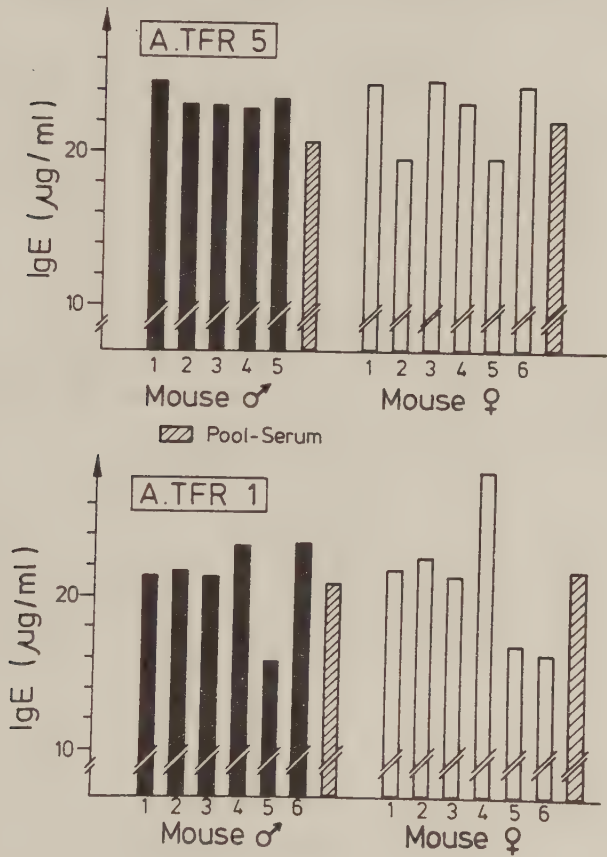


Abb. 19: Die Individualtiter (µg/ml) - totales IgE - von männlichen und weiblichen HR- (A.TFR5)- und NR- (A.TFR1)-Mäusen am 7. Tag nach Reinfektion.

RESPONDER-GROUP (SPECIFIC IgE)	STRAIN	SEX	NO. OF MICE N	POOL-SERUM ($\mu\text{G/ML}$)	INDIVIDUAL-SERA $\bar{x} \pm \text{SE}$ ($\mu\text{G/ML}$)
HIGH-RESPONDER	B 10.M	♂	6	13.7	13.9 $\pm$ 2.2
	B 10.M	♀	5	13.0	15.6 $\pm$ 2.6
	A.CA	♂	5	20.5	21.7 $\pm$ 1.8
	A.CA	♀	6	20.1	24.0 $\pm$ 3.2
	A.TFR 5	♂	5	20.7	23.4 $\pm$ 0.7
	A.TFR 5	♀	6	22.1	22.7 $\pm$ 2.4
MEDIUM-RESPONDER	CBA / LAC	♂	6	17.8	19.2 $\pm$ 1.2
	CBA / LAC	♀	5	16.9	17.3 $\pm$ 2.9
	C3H.CL	♂	5	19.4	N.D. - N.D.*
	C3H.OL	♀	5	19.3	N.D. - N.D.
	B 10.A (2R)	♂	6	12.5	14.8 $\pm$ 1.5
	B 10.A (2R)	♀	6	17.1	16.2 $\pm$ 2.9
	B 10.A (4R)	♂	5	15.7	N.D. - N.D.
	B 10.A (4R)	♀	5	14.7	N.D. - N.D.
NON-RESPONDER	A.FTR 1	♂	6	20.8	21.1 $\pm$ 1.8
	A.FTR 1	♀	6	21.7	21.1 $\pm$ 4.4
	C3H.SW	♂	5	21.1	17.6 $\pm$ 1.2
	C3H.SW	♀	5	19.1	18.2 $\pm$ 3.2

Tab. 10: Vergleich des IgE-Gehalts von Pool-Seren ($\mu\text{g/ml}$) mit dem errechneten Mittelwert ($\bar{x}$, rechte Spalte der Tabelle) der Individual-Seren verschiedener Inzucht-Mäusestämme am 7. Tag nach N.b.-Reinfektion. (N.D. = nicht getestet).

dem schon in Kap. D.I.2.2.1. beschriebenen Resultat, daß keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bestehen (einzige Abweichung bei B10.A (2R), das Poolserum der männlichen Tiere liegt zu niedrig, vgl. Mittelwert der Individualseren), zeigt sich deutlich, daß der rechnerisch ermittelte Mittelwert der Individualseren gut mit dem Wert des IgE-Gehalts der Poolseren übereinstimmt. Dies ist wiederum eine Bestätigung (vgl. Kap. D.I.1.1.1.4., Pool- und Einzelseren bei der Bildung von spezifischem IgE), daß sich die Verwendung von Poolseren und deren Vergleich untereinander nicht wesentlich von der Austestung individueller Seren unterscheidet und zu den gleichen Ergebnissen führt.

D.I.3. Die Antikörperproduktion gegen N.b.

Die beschriebenen Experimente befaßten sich mit der Frage, wie sich verschiedene Mäusestämme im Verlauf der Infektion und Reinfektion mit N.b. bezüglich der spezifischen IgE-Antikörperbildung sowie der Gesamt-IgE-Produktion verhalten. Im folgenden soll ein Vergleich zwischen der antigenspezifischen und unspezifischen Antikörperbildung gezogen werden. Weiterhin sollte geklärt werden, inwieweit Parallelen zu einem zytotropen Antikörper, dem IgG₁, bestehen und ob Unterschiede in der Produktion von spezifischen Antikörpern gegen N.b., unabhängig von der Klassenspezifität, auftreten.

D.I.3.1. Der Vergleich von spezifischer und totaler IgE-Produktion

In Tabelle 11 sind die spezifische IgE-Antikörperbildung (PCA-Titer) und der Gesamt-IgE-Gehalt ($\mu\text{g/ml}$) im Serum von reinfizierten Mäusen am 5. und 10. Tag nach der Zweitinfektion dargestellt. Aus dieser Zusammenstellung geht der grundlegende Unterschied klar hervor. Bezüglich des spezifischen IgE gibt es deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Mäusestämmen. NR-Tiere bilden kein spezifisches IgE, dagegen gibt es neben LR- und MR-Stämmen einige wenige HR-Stämme, die auf die Reinfektion mit N.b. mit der Bildung von viel antigenspe-

STRAIN	DAY 5		DAY 10	
	TOTAL IGE ($\mu\text{G}/\text{ML}$)	SPEZIFIC IGE (PCA-TITER)	TOTAL IGE ($\mu\text{G}/\text{ML}$)	SPEZIFIC IGE (PCA-TITER)
A.CA	13,4	1280	18,8	1280
B 10.M	11,1	640	16,8	320
A.TFR 5	9,3	80	12,6	320
C ₃ H.OL	11,5	160	17,2	160
B 10.HTG	7,5	160	12,7	80
B 10.A (2R)	12,3	80	14,6	160
B 10.AQR	8,2	<10	11,2	160
A.TH	7,9	<10	15,3	80
B 10	9,2	40	12,7	80
B 10.BR	10,2	<10	15,5	80
B 10.G	7,4	<10	12,0	80
C57BL/6	7,7	<10	11,4	<10
A.By	10,5	<10	16,3	<10
A.TL	10,3	<10	11,3	<10
A.TFR 1	9,7	<10	12,9	<10
C ₃ H/DISN	9,7	<10	16,3	<10
B 10.A	9,1	<10	10,4	<10
B 10.A (5R)	10,3	<10	11,7	<10

Tab. 11: Vergleich von totalem ($\mu\text{g}/\text{ml}$) und spezifischem IgE (PCA-Titer) verschiedener Mäusestämme am 5. und 10. Tag nach N.b.-Reinfektion.

zifischem IgE reagieren. Andererseits läßt sich ausnahmslos für alle untersuchten Mäusestämme zeigen, daß sie alle - in der biologischen Schwankungsbreite - in gleichem Umfang nach Infektion bzw. Reinfektion der Bildung von viel IgE unterliegen, welches jedoch meistens keine oder nur geringe Antigen-spezifität besitzt.

D.I.3.2. Die Einbeziehung der spezifischen und totalen IgG₁-Produktion

Neben der Untersuchung der spezifischen und totalen IgE-Antikörperbildung wurde auch der zweite homozytotrope Antikörper der Maus, das IgG₁, untersucht. In Tabelle 12 sind die Bildung von spezifischem IgE und IgG₁ (jeweils durch die PCA-Titer repräsentiert) sowie die totale IgE- und IgG₁-Produktion (µg/ml) von einem Mäusestamm aus jeder Respondergruppe aufgezeigt. Es wird deutlich, daß der HR-Stamm B10.M und der MR-Stamm C3H.OL auch spezifische IgG₁-Antikörper gegen N.b. (PCA-Titer 1 : 160 bzw. 1 : 40) produzieren, während bei B10.G-Mäusen (LR) keine IgG₁-Antikörper nachzuweisen waren. Beim Vergleich der totalen IgG₁-Produktion mit der IgE-Bildung fällt auf, daß auch bezüglich des Gesamt-IgG₁ keine Gruppenunterschiede festzustellen sind. Die IgE-LR bzw. -NR (B10.G, A.TFR1) produzieren nach Reinfektion (Tag 7) mehr IgG₁ (919 µg/ml bzw. 871 µg/ml) als die IgE-MR bzw. -HR (C3H.OL, 781 µg/ml; B10.M, 360 µg/ml). Für die IgG₁-Produktion liegt bei B10.G bzw. A.TFR1 das Maximum am 7. Tag nach Reinfektion. C3H.OL-Mäuse zeigen einen Anstieg bis zum 14. Tag nach der Zweitinfektion, während die B10.M-Tiere keine große Veränderung aufweisen. Allerdings sind die Untersuchungen der IgG₁-Produktion nicht im gleichen Umfang wie die der IgE-Antikörperbildung durchgeführt wurden. Dennoch bestehen für diesen zytotropen Antikörper Parallelen zur IgE-Bildung. Es gibt auch bei der Bildung von spezifischem IgG₁ High- und Nonresponder und nach Reinfektion zeigt sich ein Anstieg des Gesamt-IgG₁ bei allen Stämmen.

	DAYS AFTER REINFECTION*	ANTI-Nb IgE		ANTI-Nb IgG ₁		TOTAL SERUM-IgE µg / ml		TOTAL SERUM IgG ₁	
		PCA - TITRE							
		3	7 14	3	7 14	3	7 14	3	7 14
STRAIN (RESPONDER GROUP)									
B 10.M	(HIGH)	80	1280 320	<10 160 160	9.9 13.8 11.9	N.D†	339 360		
C ₃ H.OL	(MEDIUM)	<10 320	<10	<10 40 <10	11.5 17.1 10.9	157	314 781		
B 10.6	(LOW)	<10	<10 80	<10 <10 <10	7.4 11.6 8.4	329	919 676		
A.TFR 1	(NON)	<10	<10 <10	N.D. N.D. N.D.	6.9 13.1 9.5	494	871 510		

* N.D. = NOT DONE

Tab. 12: Vergleich der spezifischen (PCA-Titer) sowie totalen (µg/ml) IgE- und IgG₁-Produktion in je einem HR-, MR-, LR- und NR-Stamm.

D.I.3.3. Die Produktion von spezifischen Ig-Antikörpern gegen N.b. (fluoreszenzserologische Untersuchungen)

Die Bildung von spezifischen Immunglobulinen gegen den Nematoden N.b. wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen (vgl. Kap. C.II.16.). Mäuseseren von nicht N.b.-infizierten Mäusen bzw. von reinfizierten Tieren wurden entweder mit Larven oder adulten Würmern von N.b. inkubiert. Die gegen N.b. gerichteten und an Larven bzw. Würmer gebundenen Antikörper wurden durch Inkubation mit einem FITC-markierten Kaninchen-anti-Maus-Antiserum, das alle Ig-Klassen umfaßte, nachgewiesen. In Tabelle 13 sind die Resultate dieser Untersuchungen dargestellt. In den getesteten Mäuseseren von nicht N.b.-infizierten Tieren wurden ausnahmslos keine Antikörper gegen die adulten Würmer nachgewiesen (rechte Spalte der Tabelle). Dagegen verfügen drei Mäusestämme (A.TFR5, SJL, A.TFR1) über Antikörper gegen N.b.-Larven; diese Antikörper treten also in Seren von Mäusen auf, die noch keinen Kontakt mit N.b. hatten.

Bei Untersuchung der Mäuseseren von Tieren, die zweimal eine Infektion mit N.b. durchlaufen hatten (Seren aus der Reinfektion), zeigte sich in allen Fällen eine positive Fluoreszenz. In diesen Seren von reinfizierten Mäusen waren Antikörper sowohl gegen Larven als auch adulte Würmer vorhanden. Bei den Untersuchungen fiel auf, daß eine positive Immunfluoreszenz hauptsächlich an den Kopfregionen der Würmer sichtbar wurde. Dies führt zu der Frage nach der/den antigenen Determinante(n) von N.b. hin, denn bei Larven war die Fluoreszenz auf den ganzen Körper verteilt. Eine weitere zu beantwortende Frage ist die natürliche Resistenz bzw. Antikörperbildung gegen N.b. oder anderer Nematoden, worauf die positive Reaktion von A.TFR5-, SJL- und A.TFR1-Mäusen hinweist. Diese drei Stämme unterscheiden sich in der Bildung von spezifischem IgE gegen N.b.: A.TFR5 ist ein HR, die beiden anderen Stämme gehören zu der NR-Gruppe. Es fällt auf, daß nicht N.b.-infizierte SJL-Mäuse auch den größten IgE-Gehalt (539 ng/ml, vgl. Tab. 8) im Serum aufwiesen. Diese Zusammenhänge der natürlich vorhandenen Antikörper, der antigenen Determinanten von N.b. und der klassenspezifischen Antikörperproduktion bedürfen noch weiterer Untersuchungen.

STRAIN	SPECIFIC IGE-RESPONSE	SERA OBTAINED FROM NO INFECTED REINFECTED MICE	FLUORESCENCE N.B.	
			N.B. LARVAE	ADULT WORMS
A.CA	H	N.I.	-	-
B 10.M	H	N.I.	-	-
A.TFR 5	H	N.I.	+	-
C3H.OL	M	N.I.	-	-
B10.HTG	M	N.I.	-	-
B10.A (2R)	M	N.I.	-	-
A.TH	L	N.I.	-	-
B 10	L	N.I.	-	-
B 10.G	L	N.I.	-	-
C 57 BL/6	N	N.I.	-	-
BALB/c	N	N.I.	-	-
SJL	N	N.I.	+	-
A.TL	N	N.I.	-	-
A.TFR 1	N	N.I.	+	-
C3H/DI SM	N	N.I.	-	-
B 10.A	N	N.I.	-	-
B 10.A (5R)	N	N.I.	-	-
A.CA	H	RE	+	+
B 10.G	L	RE	+	+
A.TFR 1	N	RE	+	+

Tab. 13: Nachweis von Antikörpern gegen N.b.
(Larven bzw. adulte Würmer) im Serum
von Mäusen durch indirekte Immun-
fluoreszenz.

+, -: positiver bzw. kein Nachweis;
N.I.: Serum nicht N.b.-infizierter Tiere;
RE: Mäuseseren aus der Reinfektion.

D.I.4. Zusammenfassung der in vivo-Experimente

Im immunparasitologischen Modell der Infektion von Inzuchtmäusen mit N.b. wird gezeigt, daß nach Erstinfektion alle Tiere einem polyklonalen Anstieg des IgE auf das 20- bis 30-fache im Vergleich zu nicht infizierten Tieren unterliegen. Dagegen findet eine genetische Kontrolle der spezifischen IgE-Antikörperantwort nach der Reinfektion über den H-2-Komplex (Ir-Gen für N.b.) statt, es gibt high-, medium-, low- und non-responder Mäuse. Bei allen Stämmen kommt es nach Reinfektion zu einem weiteren Anstieg des Gesamt-IgE, quantitative Unterschiede zwischen den Gruppen treten nicht auf. Kreuzungsexperimente zwischen HR-Mäusen und NR-Tieren zeigen, daß bezüglich des antigenspezifischen IgE ein intermediärer Erbgang vorliegt: F1-Mäuse gehören größtenteils zu den Gruppen von MR- und LR-Tieren. Die spezifische IgE-Produktion von HR-Mäusen kann in vivo durch die Behandlung der Tiere mit Serum von LR- bzw. NR-Mäusen moduliert werden. Bei der IgG₁-Bildung gibt es Parallelen zur IgE-Antikörperproduktion (HR- und NR-Stämme für antigenspezifisches IgG₁; polyklonaler Anstieg von IgG₁ nach N.b.-Infektion). Im Serum von reinfizierten Mäusen lassen sich fluoreszenzserologisch Antikörper gegen die Larvenform und adulte Würmer des Parasiten nachweisen.

D.II. Die IgE-Antikörperantwort gegen N.b. in vitro

D.II.1. Methodik der in vitro-Experimente

D.II.1.1. Versuchsaufbau und Zielsetzung

In den durchgeführten in vivo-Experimenten im immunparasitologischen Modell der Infektion von Inzuchtmäusen mit dem Nematoden N.b. wurden Erkenntnisse über die Bildung von antigenspezifischem IgE gegen N.b., die Ausprägung einer polyklonalen IgE-Aktivierung in der Erstinfektion und die Modulation der spezifischen IgE-Synthese durch Serumbehandlung gewonnen.

Nach der Durchführung dieser grundlegenden Untersuchungen wurden weiterführende Experimente konzipiert, mit deren Hilfe die Zusammenhänge der IgE-Produktion und -Sekernierung im Modell der parasitären Infektion in vitro geklärt werden sollten. Dazu standen neben den in vivo ausgetesteten verschiedensten Mäusestämmen auch das zur Messung von Mäuse-IgE etablierte System eines Solid-Phase-RIA zur Verfügung. Dieser RIA ermöglichte die praktikable Austestung von sehr vielen Versuchsansätzen und die quantitative Bestimmung des produzierten IgE. Es war somit nun die Möglichkeit gegeben, die IgE-Produktion im Mäusesystem mit den Untersuchungen in anderen Tiermodellen (vgl. Kap. B.3.) vergleichen zu können. Innerhalb dieses Modells der Infektion von Mäusen mit N.b. sollten die Einflüsse verschiedener Mitogene und die Abhängigkeit der IgE-Produktion von spezifischen N.b.-Antigenen geklärt werden. Es stellte sich weiterhin die Frage, ob Mäuseseren die IgE-Produktion auch in vitro beeinflussen können, wie es für die antigenspezifische IgE-Bildung in vivo gezeigt werden konnte (Kap. D.I.1.2.).

D.II.1.2. Untersuchte Mäuse

Die in den vorausgehenden Kapiteln dargestellten Ergebnisse der in vivo-Experimente haben gezeigt, daß es nach Erstinfektion mit N.b. bei allen Mäusestämmen zu einer polyklonalen Verstärkung der totalen IgE-Produktion kommt: die Serumwerte des IgE liegen um das 20- bis 30-fache höher als bei unbehandelten

Tieren. Nach einer Zweitinfektion stiegen die Werte des Serum-IgE noch leicht an, es waren aber keine Unterschiede bezüglich des Gesamt-IgE-Gehalts zwischen den verschiedenen Respondergruppen festzustellen, anders als bei der Produktion von antigenspezifischem IgE.

Für die in vitro-Untersuchungen wurden daher folgende Überlegungen angestellt. Zur Untersuchung von spezifischem IgE gegen N.b. sind nur HR-Stämme geeignet, denn nur diese produzieren größere Mengen von spezifischen IgE-Antikörpern. Für die Experimente zur Produktion und Modulation des totalen IgE in vitro kamen dagegen alle Mäusestämme in Betracht, da alle Stämme eine polyklonale IgE-Bildung nach der N.b.-Infektion in vivo zeigten. Für die im folgenden beschriebenen Experimente wurden daher die HR-Stämme A.CA und B10.M, NR-Mäuse Balb/c bzw. B10.D2 sowie F1-Hybridmäuse zwischen A.CA und Balb/c bzw. B10.M und Balb/c, die bezüglich der spezifischen IgE-Antwort eine intermediäre Antwort zeigten, ausgewählt und Zellen dieser Tiere verwendet.

D.II.1.3. Zellen, Zellzahl, Meß-System

Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, sind für die Produktion bzw. Sezernierung von Immunglobulinen die zu Plasmazellen differenzierten B-Lymphozyten verantwortlich. Die Antikörperproduktion der B-Zellen ist abhängig von T-Lymphozyten (Kap. B.2.2.). Diese T-Zellen produzieren verschiedene Substanzen (Lymphokine, vgl. Kap. B.3.3.3.), die ebenso bei der Antikörperproduktion gegen bestimmte Antigene von Bedeutung sind wie auch den Makrophagen im Netz der verschiedenen Zellinteraktionen eine große Rolle zukommt.

Aus versuchstechnischen Gründen wurde darauf verzichtet, bestimmte Zellpopulationen zu reinigen und zu isolieren. Zur Untersuchung der IgE-Synthese in vitro wurden Zellsuspensionen aus Milzen und mesenterialen Lymphknoten der Mäuse hergestellt, die sämtliche Zellarten enthielten (vgl. Kap. C.II.11.).

In den Kulturen mußte so viel IgE produziert werden, daß es vom Meßsystem zu erfassen war. Die Kulturüberstände wurden (nachdem die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt worden waren) in der

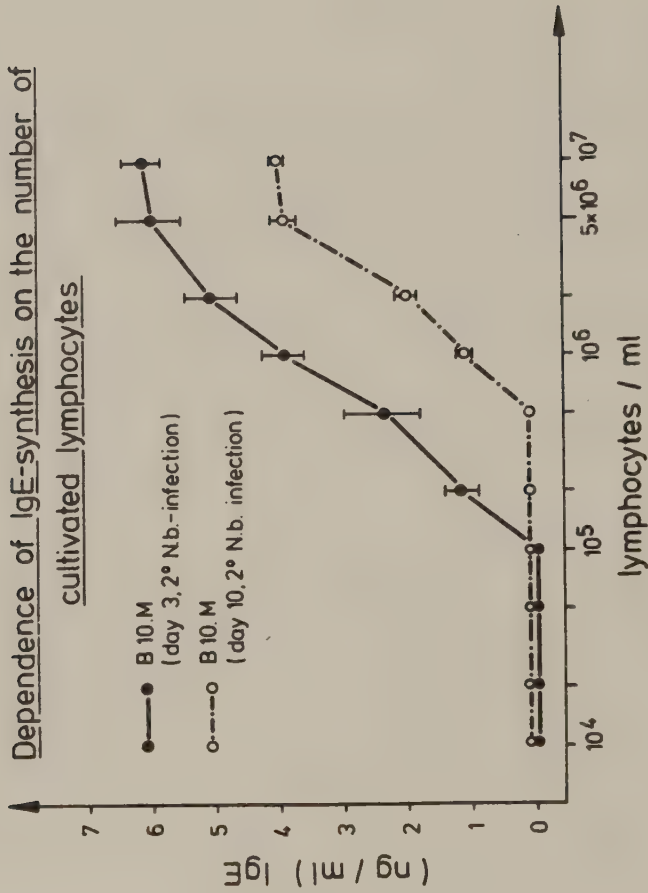


Abb. 20: Abhängigkeit der IgE-Produktion (ng/ml) von der eingesetzten Zellzahl (Lymphozyten/ml Kulturmedium) bei einer Kulturdauer von 7 Tagen.

PCA-Reaktion auf die Bildung von antigenspezifischem IgE ausgetestet. Die Menge an totalem IgE wurde im RIA (Kap. C.II.10.1.) bestimmt, wobei 100 µl der unverdünnten Kulturüberstände pro Ansatz eingesetzt wurden.

Wie aus Abbildung 20 hervorgeht, besteht eine direkte Beziehung zwischen der eingesetzten Zellzahl in der Kultur und produziertem IgE. Dargestellt ist die IgE-Produktion in vitro (ng/ml) von B10.M-Zellen nach sieben Tagen Kulturdauer in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellkonzentration. Dabei kann es zu einer Verschiebung der Kurve kommen, wenn insgesamt mehr IgE gebildet wird: B10.M-Mäuse, deren Zellen am dritten Tag nach Reinfektion entnommen wurden, produzierten mehr IgE als Zellen des gleichen Stammes, die am 10. Tag nach der Zweitinfektion in Kultur genommen wurden. Das Maximum der IgE-Produktion wird aber jeweils bei einer Zellkonzentration von 5×10^6 Zellen/ml erreicht. Bei dieser Konzentration bestand ein sehr guter Zellkontakt untereinander, wie lichtmikroskopisch festgestellt werden konnte; die Zellen bildeten auf dem Boden der Kulturplatten dichte Rasen.

Für alle Experimente wurde daher diese Zellkonzentration eingesetzt. Jeder Versuchsansatz wurde in Duplikaten angelegt, die Kulturüberstände jeder Doppelbestimmung wurden dann im RIA wiederum in Duplikaten ausgetestet. Aus Milz und mesenterialen Lymphknoten einer Maus wurden nach der in C.II.11.1. beschriebenen Methode durchschnittlich 2×10^8 Zellen gewonnen. Damit für die verschiedenen Versuchsansätze eine ausreichende Zahl an Zellen zur Verfügung stand sowie individuelle Unterschiede und Abweichungen der Mäuse kompensiert werden konnten, wurden für jeden Versuch die Zellen von mindestens zwei Tieren gemischt und verwendet.

D.II.1.4. Kulturdauer und Viabilität

Lymphozyten sind in vitro im Gegensatz zu Hybridomzellen nicht unbegrenzt lebens- bzw. vermehrungsfähig. Es stellte sich die Frage, in welchem Zeitraum die Zellen kultiviert werden konnten, ohne daß es zu einer Schädigung der Zellen kam und diese.

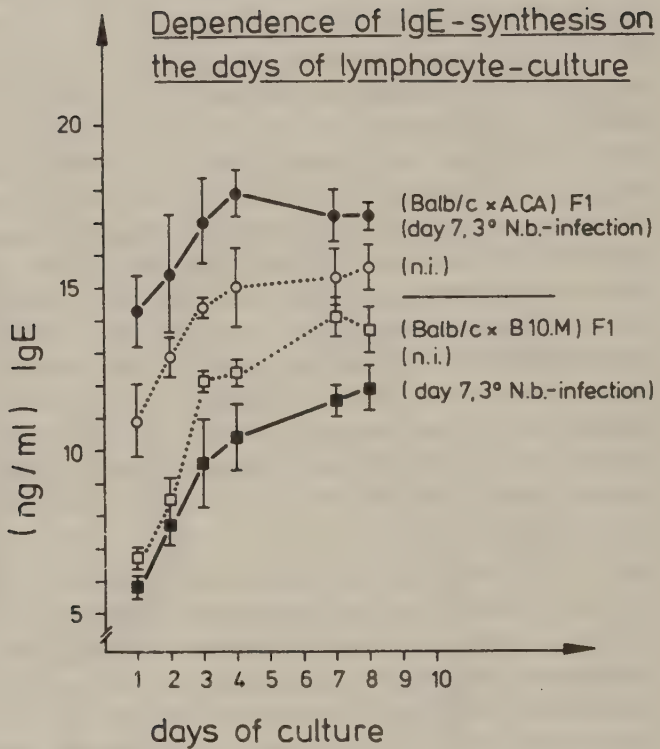


Abb. 21: Abhängigkeit der IgE-Bildung (ng/ml) von der Kulturdauer bei Einsatz einer konstanten Zellzahl (5×10^6 Lymphozyten/ml).

abstarben. Andererseits sollte viel IgE sezerniert werden, damit die Grenze des Meß-Systems (1 ng/ml) deutlich überschritten wurde. In Abbildung 21 ist die Abhängigkeit der IgE-Produktion von der Kulturdauer aufgezeigt. Die Kurven stellen die IgE-Produktion von F1-Mäusen aus Kreuzungen zwischen Balb/c und A.CA bzw. Balb/c und B10.M dar. Es wurden 5×10^6 Zellen/ml eingesetzt. Bei reinfizierten (A.CA x Balb/c)-Mäusen wird das Maximum der IgE-Bildung im Kulturüberstand schon am 4. Kulturtag erreicht, danach bestand ein Plateau bis zum 8. Tag. Der IgE-Spiegel erreicht in den anderen Fällen erst am 7. bis 8. Tag nach Kulturbeginn den Maximalstand. Die Viabilitätsbestimmung der kultivierten Zellen ergab, daß nach einem Kulturtag 87 %, nach zwei Tagen 70 %, am vierten Tag 65 % und am 7. Tag nach Kulturbeginn noch 60 % aller eingesetzten Zellen lebten (Trypanblau-Ausschlußtest, vgl. Kap. C.II.11.3.). In allen Experimenten wurden die Zellen daher sieben Tage kultiviert, danach abzentrifugiert und der zellfreie Kulturüberstand ausgetestet.

D.II.2. Nachweis von spezifischem IgE in vitro

Analog zu den in vivo durchgeführten Experimenten sollte auch in vitro die Bildung von spezifischem IgE gegen N.b. untersucht werden. Dazu wurden die Kulturüberstände in der PCA-Reaktion ausgetestet, die Reaktion mit homologem Antigen (N.b.-Homogenat) wie beschrieben ausgelöst (Kap. C.II.5.). Diese Untersuchungen führten allerdings zu negativen Resultaten. Bei Einsatz von 5×10^6 Zellen/ml und einer Kulturdauer von sieben Tagen konnten nur in zwei Experimenten spezifische IgE-Antikörper gegen N.b. in vitro nachgewiesen werden. Bei reinfizierten A.CA-Mäusen, deren Zellen am sechsten Tag nach Reinfektion in Kultur genommen wurden sowie bei F1-Mäusen (B10.M x Balb/c, 4. Tag nach Reinfektion) konnten in Kulturüberständen, die unverdünnt eingesetzt wurden, in acht von 72 Ansätzen bzw. sechs von 72 Ansätzen eine positive Reaktion nachgewiesen werden; bei Verdünnung (1 : 2 ff) verschwand diese dann.

Es waren also auf diesem Wege keine verwertbaren Ergebnisse zu erhalten. Der positive Nachweis, daß die Zellen reinfizierter Mäuse in vitro antigenspezifisches IgE gegen N.b. produzierten, war erbracht. Quantitative Aussagen und Vergleiche sowie die Beeinflussung der spezifischen IgE-Antwort durch verschiedene Faktoren konnten mit dieser Methode aber nicht untersucht werden. Daher wurden alle Untersuchungen, die im folgenden beschrieben werden, für die Messung der totalen IgE-Produktion konzipiert und durchgeführt.

D.II.3. Die Synthese von IgE in vitro und die Versuche zur Modulation der IgE-Synthese

D.II.3.1. IgE-Synthese im Verlauf der N.b.-Infektion

Grundlage für alle weiterführenden Versuche einer Modulation der IgE-Synthese war die Kenntnis über die spontane IgE-Produktion im Verlauf der Infektion bzw. Reinfektion mit N.b. Den Mäusen wurden an verschiedenen Tagen im Infektionszyklus Milz- und mesenteriale Lymphknoten entnommen und die Zellen ohne weitere Zusätze im Kulturmedium für sieben Tage inkubiert. Danach erfolgte die Messung des produzierten IgE. In Tabelle 14 ist die Spontan-IgE-Synthese der untersuchten Mäuse dargestellt. Nicht N.b.-infizierte HR-Mäuse (A.CA) produzierten gleichviel IgE wie die Tiere der F1-Generation aus den Kreuzungen zwischen A.CA und Balb/c bzw. B10.M und Balb/c (11 - 12 ng/ml bzw. 10 - 15 ng/ml). In einem Experiment lag die Spontansynthese der (B10.M x Balb/c) F1-Mäuse nur bei 5 ng/ml IgE. Zellen von nicht infizierten Balb/c-Mäusen (NR) produzierten wenig IgE (4ng/ml). In mehreren Experimenten gelang es nicht, bei kultivierten Zellen des NR-Stammes B10.D2 IgE im Kulturüberstand nachzuweisen. Wurden dagegen Balb/c- und B10.D2-Mäuse einer Röntgenbestrahlung von 150 R unterzogen und die Zellen 17 Tage nach erfolgter Bestrahlung in Kultur gebracht, so stiegen die Werte des produzierten IgE auf 11 - 12 ng/ml. Das entspricht der Menge des von den nicht infizierten HR-Tieren gebildeten IgE.

SPONTANEOUS IgE - SYNTHESIS IN VITRO (NG / ML)																		
MICE	SPECIFIC IgE- RESPONSE	NON INFECTED	DAYS AFTER INFECTION (1°)								DAYS AFTER REINFECTION (2°)							
			4	6	7	10	11	14	26	1	2	3	4	5	6	7	8	10
A.CA	H	11	—12—13—								—							
A.CA	H	12	—11								—24 25—							
B 10.M	H	N.D.	—								— 6 — 4 — 4 —							
(BALB/c x A.CA) F1	N/H	15/12	—								—23 —17 — 9							
(BALB/c x B 10.M) F1	N/H	14/10	—								—16 —12 —12							
(BALB/c x B 10.M) F1	N/H	5	7—8—7 7—								12—15—12—16—14							
BALB/c	N	4	—								—21—							
B 10.D2	N	< 1	—								—							
BALB/c (150 R)	N	12	—14—								-15 10—							
B 10.D2 (150 R)	N	11	—10—								-10 7—							

Tab. 14: Die spontane IgE-Synthese in vitro.

Zellen (5×10^6 /ml), die von nicht N.b.-infizierten Mäusen sowie Tieren nach Erst- bzw. Zweitinfektion entnommen worden waren, wurden 7 Tage mit Kulturmedium inkubiert. Danach wurde der IgE-Gehalt (ng/ml) des Kulturüberstandes im RIA bestimmt.

Im Verlaufe der Erstinfektion mit N.b. war nur eine geringe Steigerung (A.CA: von 11 ng/ml auf 13 ng/ml; B10.M x Balb/c: von 5 ng/ml auf 8 ng/ml; bestrahlte Balb/c: von 12 ng/ml auf 14 ng/ml) oder keine Veränderung der IgE-Synthese in vitro zu beobachten. Dagegen wurde die IgE-Produktion erheblich gesteigert, wenn Zellen aus reinfizierten Tieren kultiviert wurden. Das Maximum lag dabei zwischen dem 4. und 8. Tag nach Reinfektion. Bei A.CA-Mäusen stieg die IgE-Konzentration von 12 ng/ml (nicht infizierte Tiere) auf das Doppelte an (24 - 25 ng/ml, Tag 5 und 6 nach Reinfektion). Bei (Balb/c x A.CA) F1-Mäusen konnte ebenso fast eine Verdoppelung der IgE-Synthese beobachtet werden (Anstieg von 12 - 15 ng/ml auf 23 ng/ml). F1-Mäuse aus Kreuzungen zwischen Balb/c und B10.M steigerten die IgE-Produktion um den Faktor 3 von 5 ng/ml auf 15 - 16 ng/ml. Balb/c-Zellen erreichten sogar die fünffache IgE-Produktion (21 ng/ml, 5. Tag nach Reinfektion) im Vergleich zu Zellen von nicht infizierten Tieren (4 ng/ml).

Ein anderes Ergebnis wurde erhalten, wenn Zellen aus reinfizierten Mäusen (Balb/c, B10.D2), die vor der Erstinfektion bestrahlt worden waren, verwendet wurden. Diese Mäuse zeigten nach der Reinfektion keine Steigerung der totalen IgE-Synthese in vitro. Allerdings wurden bei diesen Stämmen keine Zellen zwischen dem 4. und 8. Tag der Reinfektion untersucht, also an den Tagen der maximalen IgE-Produktion von anderen Stämmen. Bei (Balb/c x B10.M) F1-Mäusen findet dagegen schon am ersten Tag nach Reinfektion eine Steigerung der IgE-Synthese statt. Bei den bestrahlten Tieren fällt der Rückgang auf 10 ng/ml (Balb/c) bzw. 10 - 7 ng/ml (B10.D2) am zweiten und dritten Tag nach Reinfektion auf, also auf Werte, die unterhalb derer von nicht infizierten Vergleichstieren liegen.

Es wurde also zusammenfassend festgestellt, daß die meisten Mäuse, nicht mit N.b. infiziert, eine spontane IgE-Synthese zwischen 10 ng/ml und 15 ng/ml produzierten bzw. durch vorherige Röntgenbestrahlung zu einer Syntheseleistung diesen Umfanges beeinflußt wurden. Während die Infektion von N.b. ohne größeren Einfluß auf die IgE-Synthese in vitro bleibt, führt dagegen die Reinfektion zu einer Verdoppelung bzw. Verfünffachung der Spontansynthese.

D.II.3.2. Modulation der IgE-Synthese durch Mitogene

Wie durch Antigene, so lassen sich die immunkompetenten Zellen auch durch Mitogene stimulieren. Gut untersucht sind pflanzliche Mitogene wie Concanavalin A (ein T-Zell-Mitogen) oder Pokeweedmitogen, das als B-Zell-Mitogen beschrieben ist. Auch werden B-Zellen durch Lipopolysaccharide zur Proliferation gebracht. Es war nun zu klären, welche Einflüsse diese Mitogene auf die IgE-Synthese von Zellen aus N.b.-infizierten bzw. -reinfizierten Mäusen in vitro ausüben. Diese im folgenden dargestellten Ergebnisse wurden mit Zellen von A.CA- und (B10.M x Balb/c) F1-Mäusen sowie bestrahlten Balb/c- und B10.D2-Tieren erhalten.

D.II.3.2.1. Einfluß von Pokeweedmitogen (PWM) auf die IgE-Synthese

D.II.3.2.1.1. Ermittlung der optimalen Mitogenkonzentration

Vor Beginn der Syntheseexperimente wurde getestet, welche Mitogenkonzentrationen eine optimale Wirkung auf die Stimulierbarkeit der Mäusezellen ausübten. Daher wurde die Lymphozytentransformation von Zellen verschiedener Mäusestämme unter dem Einfluß von PWM untersucht. Die Zellen wurden für vier Tage kultiviert, danach vier Stunden mit ^3H -markiertem Thymidin inkubiert und anschließend die Einbaurate des radioaktiven Tracers bestimmt. Als Kontrolle wurde die Stimulierbarkeit von Zellen ohne PWM-Zugabe überprüft. Es stellte sich heraus, daß PWM die Lymphozytentransformation nur wenig beeinflusste, der Stimulationsindex (Quotient aus Einbaurate der stimulierten Zellen und der Einbaurate der Kontrollzellen) lag zwischen fünf und zehn, ein schwaches Optimum der Stimulation zeigte sich bei einer PWM-Konzentration von $0,2 \mu\text{g/ml}$. Da von der Stimulierbarkeit aller Zellen nicht auf die Syntheseleistung der IgE-sezernierenden Zellen geschlossen werden konnte, wurden auch Vorversuche zur IgE-Synthese mit verschiedenen PWM-Konzentrationen durchgeführt. Dabei erwies sich die im Proliferationsassay gefundene Optimalkonzentration ($0,2 \mu\text{g/ml}$) nicht in allen Fällen auch als wirksamste Mitogenkonzentration für die IgE-

Produktion. So wurden noch zwei ergänzende PWM-Konzentrationen für die weiteren Experimente verwendet (1 µg/ml, 0,1 µg/ml), außerhalb deren Grenzen keine stimulierenden Einflüsse auf die Thymidineinbaurate oder Syntheseleistung gefunden worden waren.

D.II.3.2.1.2. PWM-Einfluß im Verlauf der N.b.-Infektion

D.II.3.2.1.2. a) Hybridmäuse

Von F1-Mäusen (Balb/c x B10.M) wurden die Zellen an verschiedenen Tagen der Infektion bzw. Reinfektion entnommen und nach sieben Tagen Kulturdauer die produzierte IgE-Menge gemessen. Als Kontrolle wurde an jedem Versuchstag die Spontansynthese bzw. Mediumkontrolle, d. h. die IgE-Produktion von Zellen ohne PWM-Zugabe, bestimmt. In Abbildung 22 sind die Ergebnisse mit diesem Hybridstamm dargestellt. Werden Zellen nicht N.b.-infizierter Tiere in Kultur genommen, so wird die IgE-Synthese unter PWM-Einfluß stark erhöht: PWM in einer Konzentration von 0,2 µg/ml steigert die IgE-Synthese um 80 % (von 4,9 ng/ml auf 8,8 ng/ml), Konzentrationen von 1 µg/ml bzw. 0,1 µg/ml führen zu einer Steigerung von 50 %. Im Verlauf der Erstinfektion wird der Einfluß von PWM auf die IgE-Synthese merklich geringer. Am vierten Tag nach Infektion liegt die Steigerung nur noch zwischen 15 % (0,1 µg/ml) und 40 % (0,2 µg/ml). Am siebten Tag ist dagegen ein supprimierender Effekt aller drei PWM-Konzentrationen zu beobachten; dieser beträgt 10 - 25 %, wobei 1 µg/ml PWM die stärkste hemmende Wirkung zeigt. Während am elften Tag nur bei zwei Mitogenkonzentrationen geringe steigende Einflüsse auftreten (1 µg/ml: 23 %, 0,2 µg/ml: 15 %), ist zwei Wochen nach N.b.-Infektion keine Beeinflussung der IgE-Synthese in vitro durch PWM erkennbar, die Werte entsprechen der Spontansynthese.

In der Reinfektion zeigt sich ein ähnliches Bild. Zellen, die den Mäusen einen Tag nach erfolgter Zweitinfektion entnommen wurden, werden durch alle drei verwendeten PWM-Konzentrationen zu erhöhter IgE-Synthese stimuliert (23 - 35 %). Am vierten Tag nach Reinfektion führt Mitogenzugabe dagegen zu einer leichten Suppression - die Werte liegen niedriger als die der

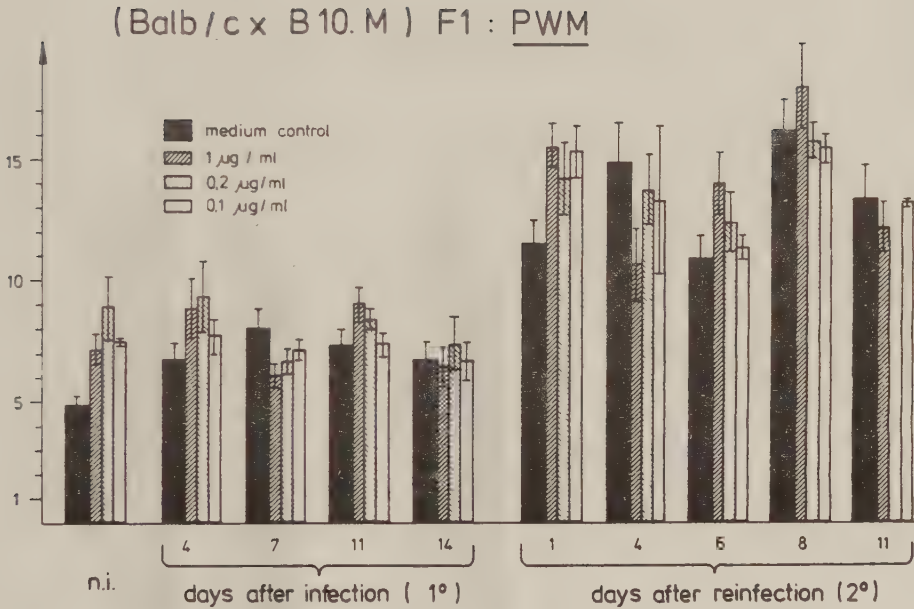


Abb. 22: Die IgE-Produktion von (Balb/c x B10.M) F1-Zellen im Verlauf der N.b.-Infektion unter Einfluß von Pokeweed Mitogen (PWM).

n.i.: Zellen nicht infizierter Mäuse;

medium control: die Zellen wurden ohne Mitogenzusatz - nur mit Kulturmedium - inkubiert;

1°: Erstinfektion, 2°: Reinfektion mit N.b.

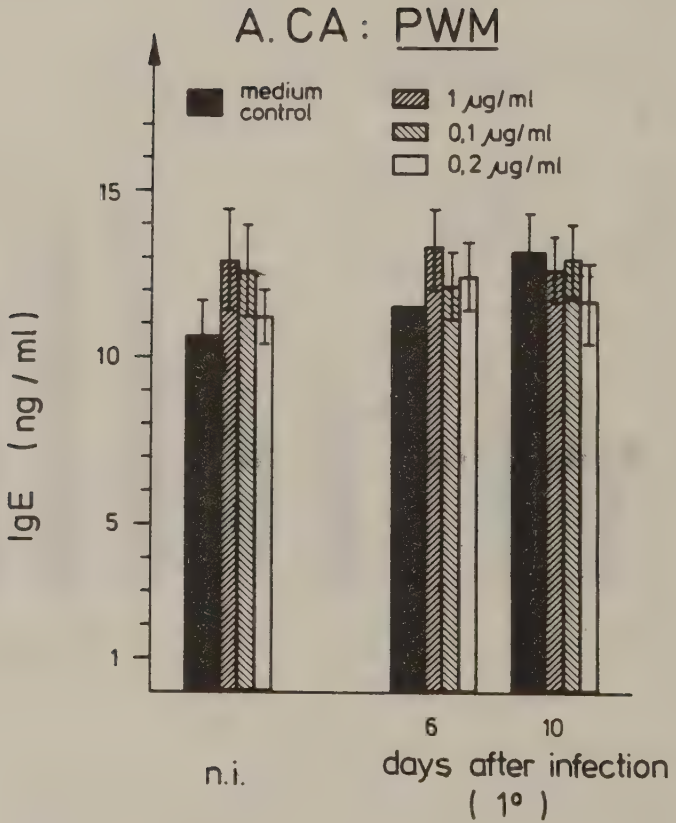


Abb. 23: IgE-Synthese von A.CA-Zellen unter Einfluß von Pokeweed Mitogen.

(Legende siehe Abb. 22, S. 129).

Spontansynthese - der IgE-Produktion, wobei wiederum die höchste Mitogenkonzentration (1 µg/ml) zu der größten Suppression (28 %) führt. An Tag 6 nach Reinfektion ist ebenso wie am achten Tag eine steigernde Wirkung dieser PWM-Konzentration zu beobachten (29 % bzw. 11 %). Dagen führen die beiden anderen Konzentrationen nur zu einem sehr geringen Anstieg (0,2 µg/ml: 15 %) oder haben keine Wirkung. Am elften Tag nach Reinfektion wird die IgE-Synthese durch PWM ebenfalls nicht beeinflusst.

Vergleicht man die Werte der Spontansynthese mit den Werten, die durch PWM-Stimulation erreicht werden, fällt folgendes auf: die PWM-Zugabe führt nicht zu höheren oder nur sehr geringfügig erhöhten Werten der IgE-Synthese im Vergleich zur Spontansynthese am Maximum der Infektion bzw. Reinfektion. So werden am siebten Tag nach Infektion 8,1 ng/ml IgE ohne PWM-Zugabe produziert; durch Mitogenstimulation kann die IgE-Produktion von nicht infizierten Mäusen bzw. am vierten und elften Tag nach Infektion auf maximal 9 ng/ml erhöht werden. Im Verlauf der Reinfektion wird dies noch deutlicher. Der maximale Spontansynthesewert (Tag 8, 16,2 ng/ml) wird von PWM-stimulierten Zellen (Tag 1 bzw. 6 nach Reinfektion) nicht erreicht. Einzig 1 µg/ml PWM am Tag 8 steigert die IgE-Synthese auf 18 µg/ml.

D.II.3.2.1.2. b) HR-Mäuse

In gleichen Versuchsansätzen wurde die IgE-Synthese von A.CA-Mäusen unter PWM-Einfluß untersucht (Abb. 23). Die Zellen wurden von nicht N.b.-infizierten Mäusen sowie an zwei Tagen nach Erstinfektion gewonnen, in Kultur genommen und mit den gleichen PWM-Konzentrationen (1 µg/ml; 0,2 µg/ml; 0,1 µg/ml) inkubiert, wie es für die F1-Tiere der Fall war.

Es zeigte sich, daß die IgE-Synthese nicht infizierter Tiere durch PWM-Zusatz (1 µg/ml bzw. 0,2 µg/ml) um ungefähr 20 % gesteigert wurde. Am sechsten Tag nach Infektion ging diese Stimulation auf 15 % (1 µg/ml) zurück und am zehnten Tag nach N.b.-Infektion war fast kein PWM-Einfluß feststellbar, bei Zusatz von 0,1 µg/ml sogar eine leichte Suppression (10 %). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen von Tag 4 und 11

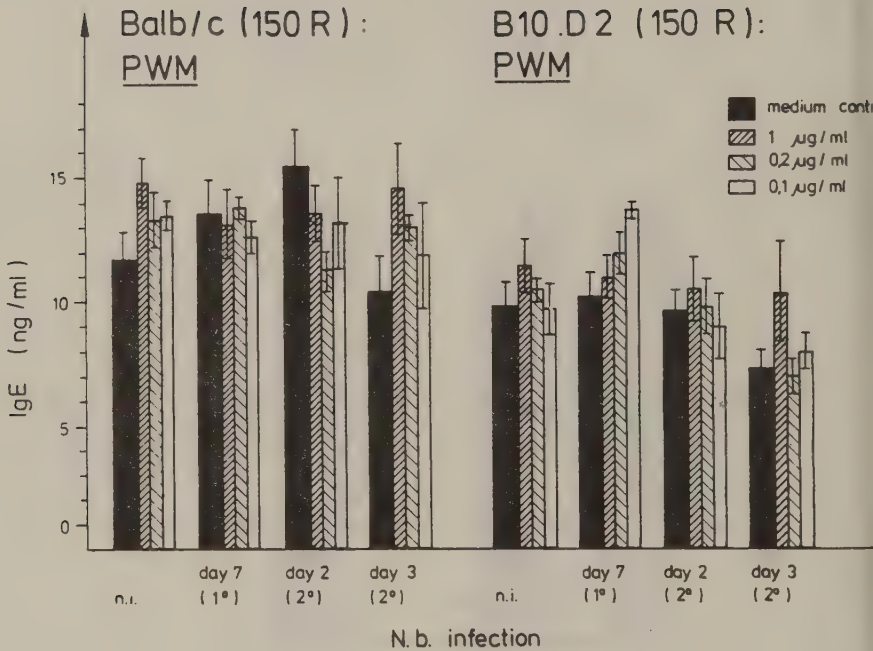


Abb. 24: Die IgE-Synthese unter PWM-Einwirkung von bestrahlten (150 R) Balb/c- und B10.D2-Zellen im Verlauf der N.b.-Infektion. (Legende vgl. Abb. 22, S. 129).

der Infektion bzw. 7 und 14 nach Reinfektion der F1-Mäuse. Auch bei den A.CA-Zellen übertrifft die PWM-stimulierte IgE-Synthese der nicht infizierten Tiere bzw. der Mäuse am sechsten Infektionstag nicht den Wert der Spontansynthese am zehnten Tag nach Infektion.

D.II.3.2.1.2. c) Bestrahlte NR-Mäuse

Der PWM-Einfluß auf die IgE-Synthese wurde abschließend auch bei bestrahlten NR-Mäusen (Balb/c bzw. B10.D2) untersucht. Diesen Tieren wurden Milz- und Lymphknotenzellen am siebten Tag nach Infektion bzw. am zweiten und dritten Tag nach der Reinfektion entnommen; die Bestrahlung (150 R) erfolgte vor der Erstinfektion. Die mit den Zellen dieser Tiere erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

Bei nicht infizierten Tieren führt die PWM-Zugabe zu einer geringeren Steigerung der IgE-Synthese (15 - 25 % Balb/c, 10 - 15 % B10.D2) als es bei F1-Hybridmäusen beobachtet worden war (50 - 80 %, Abb. 22). Balb/c-Zellen vom siebten Tag der Infektion konnten durch PWM nicht stimuliert werden, dagegen kommt es bei B10.D2 mit 0,1 µg/ml zu einer Steigerung von 35 %, die beiden anderen Konzentrationen führen zu einer 10 - 20 %igen Erhöhung der IgE-Produktion. Am zweiten Tag nach Reinfektion liegt die Spontansynthese von Balb/c-Zellen bei 15,4 ng/ml, PWM-Zusatz (alle Konzentrationen) supprimiert die Synthese um bis zu 27 %. Bei B10.D2 zeigt PWM am gleichen Tag keinen Einfluß auf die Synthese und am dritten Reinfektionstag steigert nur die stärkste Mitogenkonzentration (1 µg/ml) die IgE-Bildung um 40 %. Diese Steigerung wird am dritten Tag auch bei Balb/c-Zellen erreicht; bei ihnen führen auch die geringeren PWM-Konzentrationen noch zu einem Ansteigen der IgE-Synthese (15 - 25 %). Für die Zellen von bestrahlten Balb/c-Zellen gilt wiederum, daß die PWM-Stimulation nicht die höchste Spontansynthese von IgE im Infektionsverlauf übertrifft, bei B10.D2-Zellen wird diese Aussage am siebten Tag nach Erstinfektion nicht bestätigt.

D.II.3.2.2. Abhängigkeit der IgE-Synthese von Lipopolysaccharid (LPS)

D.II.3.2.2.1. Ermittlung der optimalen Mitogenkonzentration

Analog der Vorversuche zur Ermittlung der optimalen PWM-Konzentration wurden auch mit verschiedenen LPS-Konzentrationen Lymphozytentransformationsversuche durchgeführt. Die Konzentrationen, mit denen die höchsten Stimulationsindizes (10 - 15) erzielt wurden, variierten zwischen 2 µg/ml und 6 µg/ml. Auch Vorversuche zur IgE-Synthese zeigten mit anderen Mitogenkonzentrationen keine wesentlichen Abweichungen, so daß diese zwei LPS-Konzentrationen und zusätzlich die suboptimale Dosis von 0,6 µg/ml für die folgenden Untersuchungen verwendet wurden.

D.II.3.2.2.2. LPS-Einfluß im Verlauf der N.b.-Infektion

Das B-Zell-Mitogen LPS wurde in den gleichen Versuchen parallel zur PWM-Stimulation, d. h. mit Zellen der gleichen Versuchstiere ausgetestet.

D.II.3.2.2.2. a) Hybridmäuse

Der Verlauf der IgE-Synthese unter LPS-Einfluß ist in Abbildung 25 dargestellt. Die IgE-Produktion von Zellen nicht infizierter Mäuse kann durch LPS um 10 % und 30 % gesteigert werden. Im Verlauf der Erstinfektion sind keine Schwankungen von mehr als 10 % durch LPS-Zusatz zu erreichen. Das ist erst nach Reinfektion der Tiere der Fall. Am ersten Tag nach Reinfektion steigert LPS (6 bzw. 2 µg/ml) die IgE-Synthese um 28 % bzw. 40 %, nach einer geringen suppressiven Wirkung (10 %, 4. Tag) führt die Zugabe der gleichen Mitogenkonzentrationen wiederum zu einer Erhöhung der IgE-Produktion um 30 %. Am achten und elften Tag nach Reinfektion zeigen sich keine oder nur sehr geringe suppressive Einflüsse, mit Ausnahme einer Steigerung um 15 % am achten Tag (0,6 µg/ml). Insgesamt gesehen, kann der Zusatz von LPS die IgE-Synthese dieser Mäusezellen nicht über die im Infektionsverlauf als Höchstwert auftretende Spontansynthese hinaus steigern.

(Balb /c x B 10. M) F1: LPS

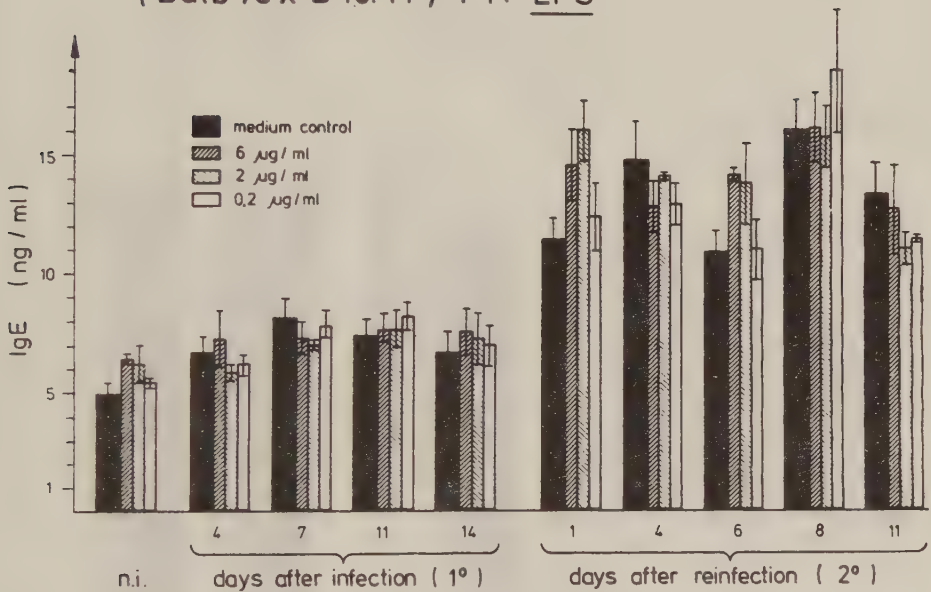


Abb. 25: LPS-Einfluß auf die IgE-Synthese von (Balb/c x B10.M) F1-Mäusen im Verlauf der N.b.-Infektion. (Legende vgl. Abb. 22, S. 129).

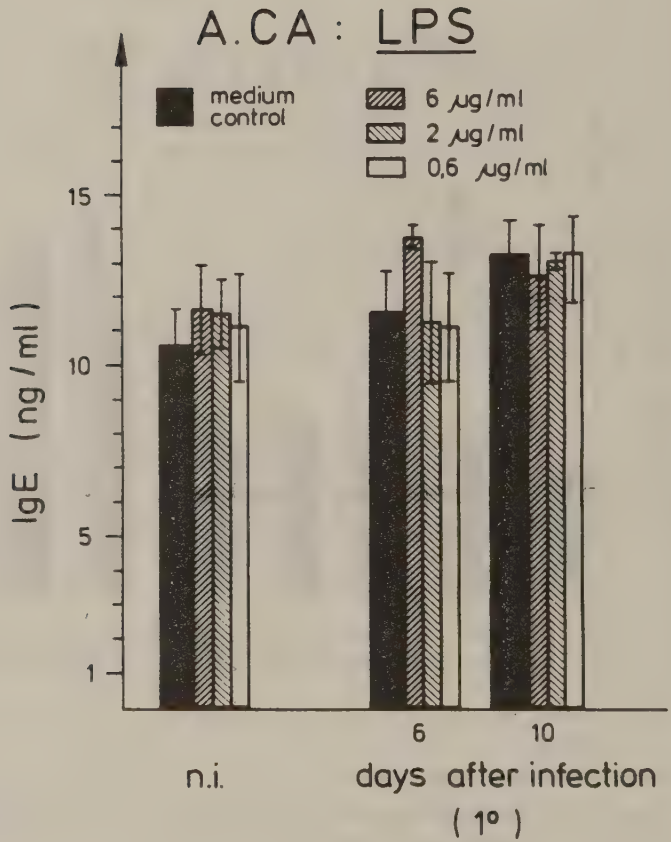


Abb. 26: IgE-Produktion von A.CA (HR)-Zellen unter LPS-Einfluß.
(Legende vgl. Abb. 22, S. 129).

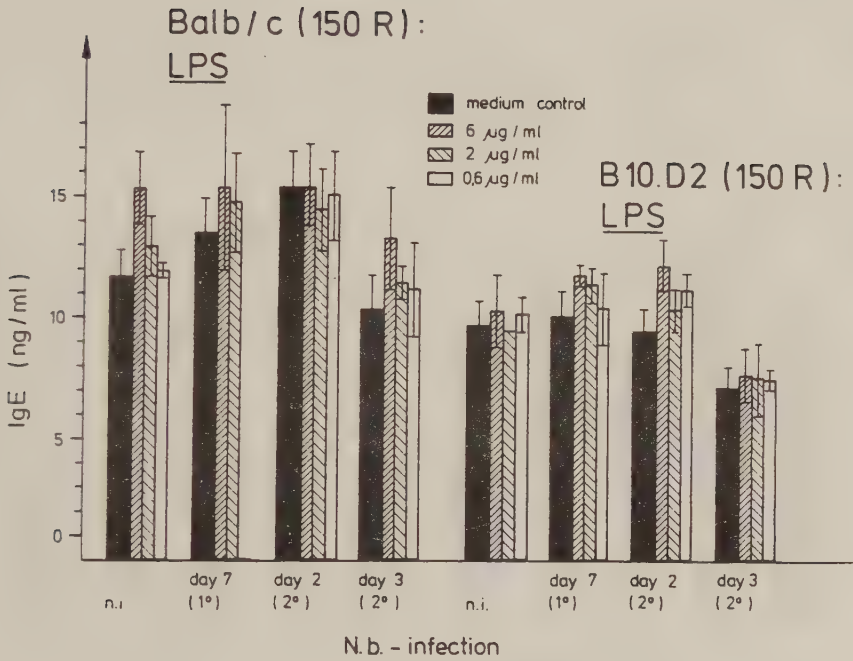


Abb. 27: Die IgE-Synthese bestrahlter Balb/c- und B10.D2-Zellen bei Zusatz von Lipopolysaccharid (LPS).
(Legende vgl. Abb. 22, S. 129).

D.II.3.2.2.2. b) HR-Mäuse

Bei Untersuchung der IgE-Synthese von A.CA-HR-Zellen (Abb. 26) fiel auf, daß die Zugabe von LPS zu Zellen nicht infizierter Tiere hier nicht zu einer deutlichen Erhöhung der IgE-Produktion führt. Auch werden die Zellen dieses Mäusestammes durch LPS-Zugabe in der Erstinfektion nicht beeinflusst; nur bei Zusatz von 6 µg/ml am sechsten Tag nach Infektion wird die IgE-Synthese um 20 % gesteigert.

D.II.3.2.2.2. c) Bestrahlte NR-Mäuse

Aus Abbildung 27 geht hervor, daß die Zellen von bestrahlten NR-Mäusen (Balb/c, B10.D2) durch LPS-Zusatz in ihrer IgE-Synthese gesteigert werden konnten und dieses B-Zell-Mitogen keine inhibierenden Einflüsse ausübte. Die LPS-Konzentration von 6 µg/ml steigert die IgE-Synthese nicht infizierter Balb/c-Zellen um 30 % (wie auch am zweiten Tag nach Reinfektion) und führt auch bei B10.D2-Zellen zu einem Anstieg von 18 % (siebter Tag Infektion) bzw. 28 % (zweiter Tag Reinfektion). Mit Ausnahme einer Erhöhung um 20 % (0,6 µg/ml, B10.D2, zweiter Tag Reinfektion) wird zu den anderen untersuchten Infektionszeiten bzw. durch andere LPS-Konzentrationen keine Veränderung der IgE-Synthese bewirkt. Wiederum übersteigt die LPS-stimulierte IgE-Synthese bei Balb/c-Zellen nicht die maximale Spontansynthese (15,4 ng/ml, zweiter Tag Reinfektion). Für B10.D2-Zellen trifft das - wie schon für PWM gezeigt - nicht vollständig zu.

D.II.3.2.3. Die IgE-Synthese unter Concanavalin A (ConA)-Einfluß

Während PWM und LPS mitogene Wirkung für B-Lymphozyten besitzen, ist ConA ein T-Zell-Mitogen, das auf die in der Kultur vorhandenen T-Zellen wirkt.

D.II.3.2.3.1. Ermittlung der optimalen Mitogenkonzentration

In den Vorversuchen mit ConA zeigte sich bei der Lymphozytentransformation, daß mit diesem T-Zell-Mitogen eine weitaus größere Stimulierbarkeit der Zellen erreicht werden konnte als

(Balb /c x B 10.M) F1 : Con A

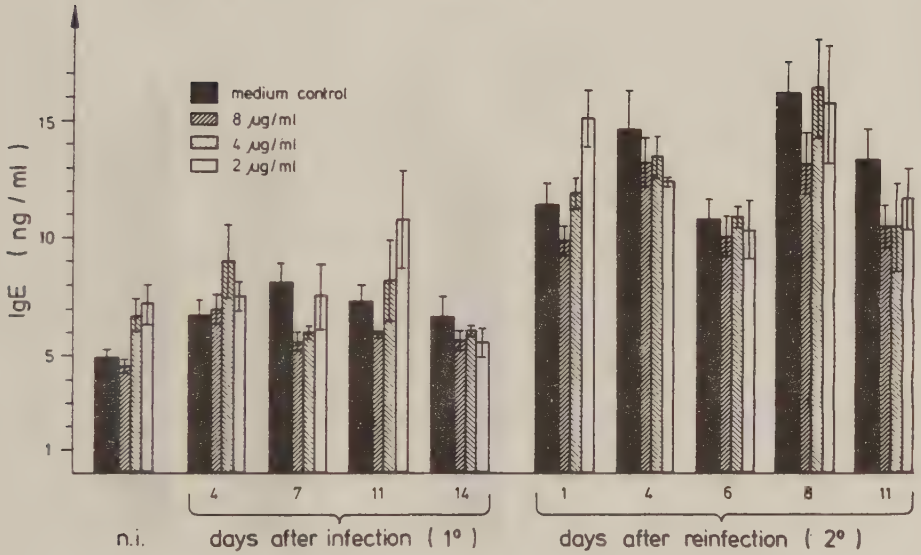


Abb. 28: Die IgE-Synthese von F1-Hybridzellen unter ConA-Wirkung im Infektionsverlauf mit N.b.
(Legende vgl. Abb. 22, S. 129).

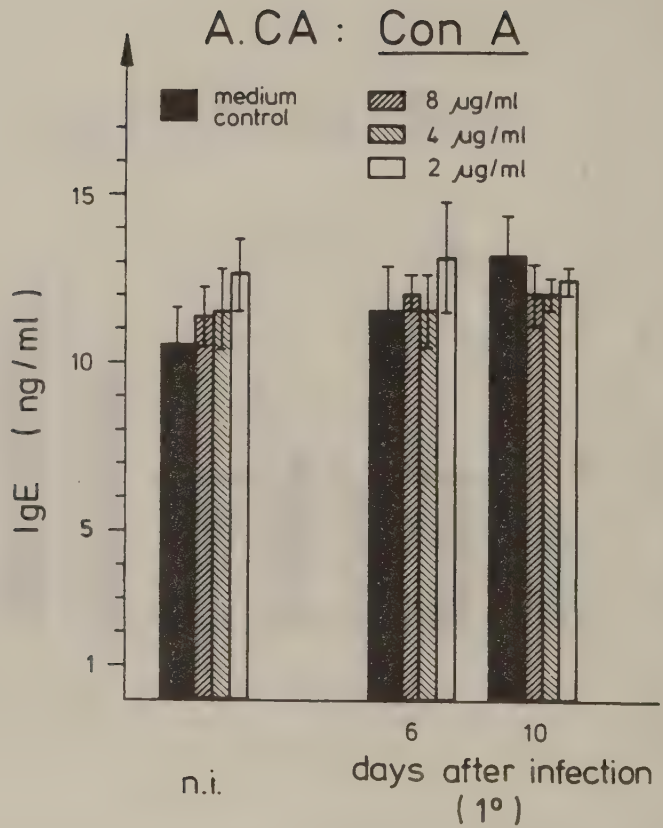


Abb. 29: Die IgE-Produktion von A.CA-Zellen unter ConA-Einfluß.

(Legende vgl. Abb. 22, S. 129).

das für PWM oder LPS möglich war. Mit ConA stimulierte Zellen zeigten eine sehr hohe Thymidineinbaurate, so daß die Stimulationsindices auf 30 bis 60 stiegen, in einigen Experimenten auch den Faktor 80 erreichten. Es wurde eine durchweg vorherrschende Optimalkonzentration von 4 µg/ml ermittelt. Neben ihr wurden dann für die Versuche zur IgE-Synthese 8 µg/ml und 2 µg/ml eingesetzt.

D.II.3.2.3.2. ConA-Einfluß im Verlauf der N.b.-Infektion

Es wurden wiederum Zellen derjenigen Tiere, bei denen auch die Einflüsse von PWM und LPS geprüft worden waren, verwendet. Es handelt sich also um identisches Versuchsmaterial unter den gleichen Versuchsbedingungen.

D.II.3.2.3.2. a) Hybridmäuse

Wie schon für PWM gezeigt (D.II.3.2.1.2. a), so steigert auch ConA (2 µg/ml, 4 µg/ml) die IgE-Synthese nicht N.b.-infizierter F1-Zellen um 47 % bzw. 37 % (Abb. 28). Im Verlauf der N.b.-Infektion wird durch Zugabe von 4 µg/ml ConA am vierten Tag eine 35 %ige und von 2 µg/ml ConA am elften Tag eine 48 %ige Steigerung der IgE-Produktion bewirkt. Diese ConA stimulierte IgE-Synthese am elften Tag (10,8 ng/ml) übertrifft als einzige den in der Erstinfektion maximalen Wert der Spontansynthese von 8,1 ng/ml (Tag 7). Mit Ausnahme des vierten Tages nach Infektion führt die Zugabe der höchsten ConA-Dosis (8 µg/ml) zu einer Suppression (zwischen 10 und 30 %) der IgE-Synthese infizierter Mäuse. In der Reinfektion wird die IgE-Produktion nur am ersten Tag durch Zusatz von 2 µg/ml ConA gesteigert (30 %). An den anderen Zeitpunkten der Reinfektion zeigt ConA keine Wirkung bzw. supprimiert die IgE-Synthese. Das gilt nicht nur für die Höchstdosis von 8 µg/ml sondern auch für die beiden anderen verwendeten Mitogenkonzentrationen (vierter und elfter Tag nach Reinfektion).

C.II.3.2.3.2. b) HR-Mäuse

Auch bei Zellen von A.CA-Mäusen führt Zusatz von ConA zu einer inhibierenden Wirkung (zehnter Tag nach Infektion, Abb. 29).

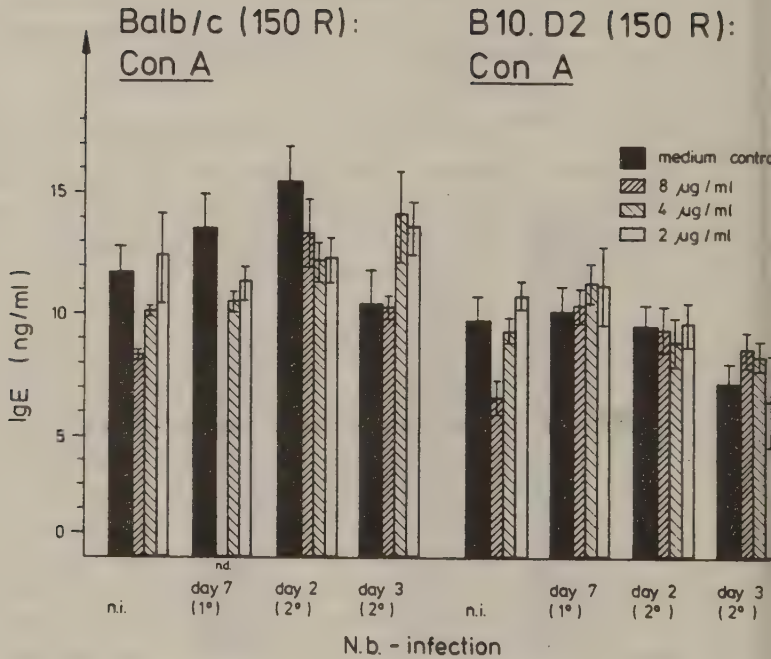


Abb. 30: Die Wirkung von Concanavalin A (ConA) auf die IgE-Synthese bestrahlter (150 R) Balb/c- und B10.D2-Zellen im N.b.-Infektionszyklus.
(Legende vgl. Abb. 22, S. 129).

Eine Stimulierung der IgE-Synthese wird nur durch eine ConA-Konzentration von 2 µg/ml am sechsten Tag nach Infektion und bei Zellen nicht N.b.-infizierter Mäuse (15 % bzw. 20 % Steigerung) erreicht. Diese Stimulation übertrifft wiederum nicht den Wert der maximalen Spontan-IgE-Synthese nach N.b.-Infektion.

C.II.3.2.3.2. c) Bestrahlte NR-Mäuse

Die Wirkung von ConA auf die IgE-Produktion bestrahlter Balb/c- und B10.D2-Zellen ist in Abbildung 30 aufgezeigt. In diesen Versuchen führten ConA-Zusatz bei Zellen nicht N.b.-infizierter Mäuse zu keiner Steigerung der IgE-Synthese. Am siebten Tag nach Infektion und am zweiten Tag nach Reinfektion suppressierte jede eingesetzte ConA-Dosis die Synthese bei Balb/c-Zellen, während am dritten Tag nach Reinfektion die Zugabe von 4 µg/ml bzw. 2 µg/ml eine Steigerung der IgE-Produktion um 30 - 35 % bewirkte. Dagegen wurde die IgE-Synthese von B10.D2-Zellen in Infektion und Reinfektion durch ConA nicht suppressiert, es kam allerdings auch nur zu geringen Steigerungen der IgE-Synthese (7. Tag 10 %; 3. Tag nach Reinfektion 15 - 18 %) nach Zugabe dieses T-Zell-Mitogens.

C.II.3.2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse mit verschiedenen Mitogenen

Die Vielzahl der Einzelergebnisse, die mit den drei verschiedenen Mitogenen (PWM, LPS, ConA) erhalten wurden und ihre Wirkung auf die IgE-Synthese in vitro bei vier verschiedenen Mäusestämmen im Verlauf der N.b.-Infektion, sind in Tabelle 15 zusammengefaßt. Dort sind die untersuchten Mäusestämme, die Tage der N.b.-Infektion bzw. -Reinfektion, an denen die Zellen der Mäuse entnommen wurden, und die drei getesteten Mitogene in ihren drei verschiedenen Konzentrationen aufgelistet. Die erhaltenen Resultate der IgE-Synthese unter Mitogeneinfluß sind in drei Gruppen aufgeteilt. Der die IgE-Produktion fördernde Mitogeneinfluß von mehr als 15 % in Bezug zur Kontroll-Spontansynthese ist als "+"-Zeichen vermerkt, eine suppressive Mitogenwirkung mit "-" bezeichnet. Kein Einfluß der Mitogen-

Mice	N.b.-infection	PWM			Con A			LPS		
		1 μ g	0,2 μ g	0,1 μ g	8 μ g	4 μ g	2 μ g	6 μ g	2 μ g	0,5 μ g
F1 (Balb/c x B10 M)	n.i.	+	+	+	-	+	+	+	+	-
	day 4 (1°)	+	+	•	•	+	•	•	•	•
	day 7 (1°)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	day 11 (1°)	+	•	•	-	•	+	•	•	•
	day 14 (1°)	•	•	•	-	•	-	•	•	•
	day 1 (2°)	+	+	+	-	•	+	+	+	•
	day 4 (2°)	-	•	•	•	•	-	-	•	•
	day 6 (2°)	+	•	•	•	•	•	+	+	•
ACA	day 8 (2°)	•	•	•	-	•	•	•	•	•
	day 11 (2°)	•	n.d.	•	-	-	-	•	-	-
	n.i.	+	•	•	•	•	+	•	•	•
	day 6 (1°)	+	•	•	•	•	•	+	•	•
Balb/c (150 R)	day 10 (1°)	•	•	-	-	-	-	•	•	•
	n.i.	+	+	+	-	-	•	+	•	•
	day 7 (1°)	•	•	•	n.d.	-	-	•	•	n
	day 2 (2°)	-	-	-	-	-	-	•	•	•
B10.D2 (150 R)	day 3 (2°)	+	+	•	•	+	+	+	•	•
	n.i.	+	•	•	-	•	•	•	•	•
	day 7 (1°)	•	+	+	•	•	•	+	+	•
	day 2 (2°)	•	•	•	•	•	•	+	•	+
	day 3 (2°)	+	•	•	+	•	•	•	•	+

Tab. 15: Mitogeneinfluf auf die IgE-Synthese in Abhängigkeit von der N.b.-Infektion - Zusammenfassung der Versuche aus Kapitel D.II.3.2.

Symbole:

+ = Mitogen steigert die IgE-Synthese mehr als 15 % über die Spontansynthese;

- = bei Mitogenzusatz wird die IgE-Produktion mehr als 15 % im Vergleich zur Spontansynthese inhibiert;

• = kein Einfluß durch Mitogengabe zu erreichen (+ 15 % zur Spontansynthese).

Spontansynthese = Inkubation der Zellen ohne Mitogen.

n. d. = nicht getestet;

n. i. = nicht N.b.-infiziert

gabe, d. h. wenn der Wert des von den Zellen produzierten IgE eine Schwankungsbreite ($\pm 15\%$) um den Kontrollwert nicht überschritt, wird durch das "●"-Zeichen repräsentiert.

D.II.3.2.4.1. Mitogeneinfluß in Abhängigkeit von der N.b.- Infektion

Bei Analyse der Ergebnisse (Tab.15) hinsichtlich der Wirkung der Mitogene auf die IgE-Synthese in Abhängigkeit von dem Zeitpunkt der N.b.-Infektion ist folgendes festzustellen: bei nicht infizierten F1-Mäusen führen sämtliche verwendeten Mitogene und -Konzentrationen, mit Ausnahme von $8\text{ }\mu\text{g/ml}$ ConA, zu einer deutlichen Steigerung der IgE-Synthese in vitro. Auch bei A.CA-Mäusen (PWM, ConA) sowie bestrahlten Tieren (Balb/c: PWM und LPS; B10.D2: PWM) führt eine Mitogenzugabe bei Zellen nicht N.b.-infizierter Tiere zu einer Steigerung der IgE-Produktion in vitro. Andererseits wird durch Addition von $8\text{ }\mu\text{g/ml}$ ConA (Balb/c, B10.D2) bzw. $4\text{ }\mu\text{g/ml}$ dieses Mitogens (Balb/c) die IgE-Synthese inhibiert. Auffallend ist auch die stimulierende Wirkung der drei Mitogene am ersten Tag nach Reinfektion (F1-Mäuse) bzw. am dritten Tag nach Reinfektion (bestrahlte Balb/c-Tiere) auf die IgE-Bildung. Dagegen werden die Zellen der F1-Mäuse am siebten Tag nach Erstinfektion durch nahezu alle Mitogenkonzentrationen in der IgE-Synthese supprimiert, das gilt auch für bestrahlte Balb/c-Zellen und PWM- bzw. ConA-Zugabe am zweiten Tag nach Reinfektion.

D.II.3.2.4.2. Vergleich der verschiedenen Mitogene und ihrer Wirkung

In Tabelle 16 ist die aufgetretene Häufigkeit der Wirkung von den drei verwendeten Mitogenen dargestellt, unabhängig von der Herkunft der Zellen, die in den Versuchen getestet wurden. Es fällt auf, daß die Zugabe von $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ PWM bzw. $6\text{ }\mu\text{g/ml}$ LPS bei 52 % bzw. 38 % der Experimente die IgE-Synthese deutlich steigern konnte. Es ist eine Abnahme der Mitogenwirkung in Abhängigkeit von der eingesetzten Mitogenkonzentration bei PWM und LPS zu erkennen.

MITOGEN CONCENTRATION (μ G/ML)		PWM			Con A			LPS		
		1	0.2	0.1	8	4	2	6	2	1
EFFECTS OF THE MITOGEN (NO. OF EVENTS)	ENHANCING ($> 15\%$)	11	6	4	1	3	5	8	4	
	SUPPRESSIVE ($> 15\%$)	3	2	3	11	6	6	2	2	
	NO EFFECT ($\pm 15\%$ TO THE CONTROL)	7	12	14	8	12	10	11	15	
Σ :		21	20	21	20	21	21	21	21	2

Tab. 16: Häufigkeiten der durch die drei getesteten Mitogene PWM, ConA und LPS indizierten Modulationen auf die IgE-Synthese verschiedener Mäuselymphozyten
- Zusammenfassung der Experimente aus Kap. D.II.3.2., ohne Berücksichtigung der Herkunft (Mäusestamm, Zeitpunkt der N.b.-Infektion) der getesteten Zellen.

Für ConA zeigt sich ein entgegengesetztes Bild: je geringer die verwendete Dosis ist desto größer ist die steigernde Mitogenwirkung. Dabei muß festgestellt werden, daß 2 µg/ml ConA - also die "Optimaldosis" - nur in 24 % aller Fälle die IgE-Synthese von Mauszellen erhöht. Dieser Effekt ist geringer als die suppressive Wirkung der gleichen Dosis (29 %). Es ist klar erkennbar, daß von dem T-Zell-Mitogen ConA häufiger eine inhibierende Wirkung ausgeübt wird als von den beiden B-Zell-Mitogenen. Diese supprimieren die IgE-Synthese nur mit einer Häufigkeit von 10 - 14 %.

Deutlich wird aber auch, daß die ganze Palette der Mitogenkonzentrationen in den meisten Fällen der Anwendung ohne Einfluß auf die IgE-Synthese bleibt. Die Häufigkeit des "Nulleffekts" schwankt zwischen 33 % (PWM 1 µg/ml) und 71 % (LPS 2 µg/ml). Dies führt noch einmal zu einem schon mehrmals beschriebenen Ergebnis zurück: in den meisten Fällen - mit Ausnahme der bestrahlten B10.D2-Mäuse, die vereinzelt davon abweichende Ergebnisse zeigten - kann die durch Mitogene stimulierte und erhöhte IgE-Synthese nicht über denjenigen Wert ansteigen, der durch die induzierte hohe Spontansynthese der Infektion bzw. Reinfektion mit N.b. vorgegeben war.

D.II.3.3. Modulation der IgE-Synthese durch N.b.-Antigen

Es gibt eine Reihe von Literaturbefunden (Bloch, Towle und Mills, 1977; Dessaint, Camus, Fisher und Capron, 1977; Stockinger, 1979; Albright und Albright, 1981; Charoenvit, Campbell und Tokuda, 1981; Campbell, Esser und Phillips, 1982), daß in parasitären Infektionen eine Modulation der Reaktivität von Zellen gegen Mitogene durch Zugabe von zellfreien Überständen kultivierter Parasiten bzw. durch parasitäres Protein erreicht wurde. Es sollte daher auch überprüft werden, ob N.b.-Antigen - in Form eines Homogenats adulter Würmer bzw. als Kulturüberstand von kultivierten Wurmern - in der Lage ist, die IgE-Synthese in vitro zu beeinflussen. Parallel dazu wurde vergleichsweise untersucht, in welcher Weise Homogenat bzw. Kulturüberstand auf die Lymphozytentransformation adäquater Zellen wirkt. N.b.-Homogenat wurde nach beschriebener Methode

(C.II.4.) gewonnen. Um Kulturüberstand von adulten Würmern zu erhalten, wurden N.b.-Würmer steril über vier Tage in RPMI 1640-Medium kultiviert. Der zellfreie Kulturüberstand wurde dann an-konzentriert und den zu testenden Zellen, wie es für die Mito-gene beschrieben wurde (D.II.3.2.), in verschiedenen Verdünnun-gen zugesetzt.

D.II.3.3.1. F1-Mäuse

Analog der Versuche zum Mitogeneinfluß auf die IgE-Synthese, wurde mit den Zellen der gleichen Mäuse (Balb/c x B10.M) die Fragestellung untersucht, ob sich die IgE-Produktion im Laufe der N:b.-Infektion durch N.b.-Homogenat bzw. -Kulturüberstand beeinflussen läßt. In Parallelversuchen wurde an drei Tagen nach Reinfektion der Tiere auch die Lymphozytentransformation unter dem Einfluß von N.b.-Antigenen untersucht und mit der Mitogenstimulierbarkeit verglichen.

D.II.3.3.1.1. IgE-Synthese unter dem Einfluß von N.b.-Homogenat

Die Ergebnisse zur IgE-Modulation von F1-Zellen durch N.b.-Homogenat sind in Abbildung 31 dargestellt. Es wurden zwei Verdünnungen getestet, die einer Proteinkonzentration von 10 µg/ml bzw. 1 µg/ml entsprechen. Die Verlaufskurven beider Verdünnungen während der N.b.-Infektion bzw. -Reinfektion sind nahezu parallel. Auffällig ist, daß Homogenat in größerer Ver-dünnung (1 µg/ml) die IgE-Synthese weniger steigern kann als die Präparation mit höherer Proteinkonzentration (10 µg/ml). Dafür wirkte die geringer konzentrierte Homogenatpräparation deutlich mehr suppressiv als die 1 : 10 verdünnte Lösung. Bei Zellen von nicht infizierten Mäusen zeigt sich eine geringe Stimulierung der IgE-Synthese (6 - 18 %). Diese wird deutlich am ersten Tag nach Reinfektion gesteigert (23 - 31 %). Eine erneute Erhöhung ist am sechsten Tag nach Reinfektion zu beob-achten (19 - 21 %). Zu suppressiven Einflüssen, besonders bei Zugabe der Homogenat-Konzentration von 1 µg/ml kommt es am vierten Tag nach Infektion (18 %) sowie am vierten, achten und elften Tag nach Reinfektion (18 %, 12 %, 17 %).

IgE-synthesis (Balb/c x B10.M) F1: Effects of N.b.-homogenate and worm-culture supernatant

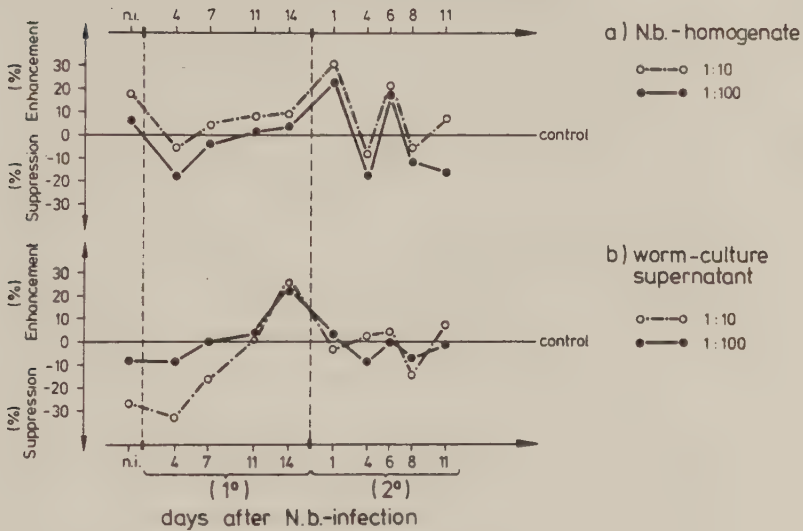


Abb. 31: Einfluß von N.b.-Homogenat (a) und Wurm-Kultur-überstand (b) auf die IgE-Synthese von F1-Hybridmäusen. Die Mäusezellen stammten aus der Erstinfektion (1° C) und Reinfektion (2° C) mit N.b. bzw. aus nicht N.b.-infizierten (n.i.) Tieren. Dargestellt ist die Inhibition (= % Suppression) bzw. Erhöhung (= % Enhancement) der IgE-Synthese unter Antigeneinfluß in Bezug zur Spontansynthese (= control).

D.II.3.3.1.2. IgE-Synthese unter dem Einfluß von N.b.-
Kulturüberstand

Setzt man den gleichen Zellen Kulturüberstand von adulten Wü-
mern zu, so zeigt sich (Abb. 31, unterer Teil), daß vor der
N.b.-Infektion und im Laufe der Erstinfektion Wirkungen auf
die IgE-Synthese erzielt werden können. Nach Reinfektion tritt
maximal eine 15 %ige Abweichung vom Kontrollwert, d. h. der
Spontansynthese, auf. Bei Zellen von nicht infizierten F1-Mäu-
sen supprimiert der Kulturüberstand die IgE-Synthese um 27 %;
diese Inhibition wird am vierten Tag nach Infektion leicht grö-
ßer (33 %). Nach einem Rückgang (17 %ige Suppression am siebten
Tag nach Infektion; kein Einfluß am elften Tag) der inhibieren-
den Wirkung und das Wechseln in einen die IgE-Produktion för-
dernden Effekt (25 % Steigerung am 14. Tag nach Infektion),
kommt es nach Reinfektion (15 % Suppression am achten Tag)
kaum zu Einflüssen auf die Produktion von IgE durch Zusatz
von N.b.-Kulturüberstand.

D.II.3.3.1.3. Vergleich von IgE-Synthese und Lymphozytentrans-
formation unter N.b.-Antigen-Einfluß

Parallel zur IgE-Synthese wurde an drei Tagen nach Reinfektion
(4., 8., 11. Tag) auch die Lymphozytenproliferation dieser
Zellen untersucht. Es ist ersichtlich, daß sowohl N.b.-Homo-
genat als auch N.b.-Kulturüberstand die Lymphozytentransforma-
tion der Zellen leicht stimulieren (Abb. 32). Im Gegensatz zur
IgE-Synthese, die am vierten Tag nach Reinfektion (1 µg, 10 µg)
und auch am achten und elften Tag mit 1 µg Homogenat suppri-
miert wurde (Abb. 31), wird die Proliferationsrate im Laufe
der Reinfektion erhöht (Abb. 32: Anstieg des Stimulations-
indexes von 1,9 auf 2,6).

Die Angabe eines Stimulationsindexes ermöglicht den Vergleich
mehrerer Versuche untereinander. Er wird als Quotient aus der
Thymidineinbaurate der Zellen unter Mitogen- bzw. Antigenein-
fluß und der Einbaurate der unbehandelten Kontrollzellen (deren
Stimulationsindex wird als 1 gesetzt) gebildet.

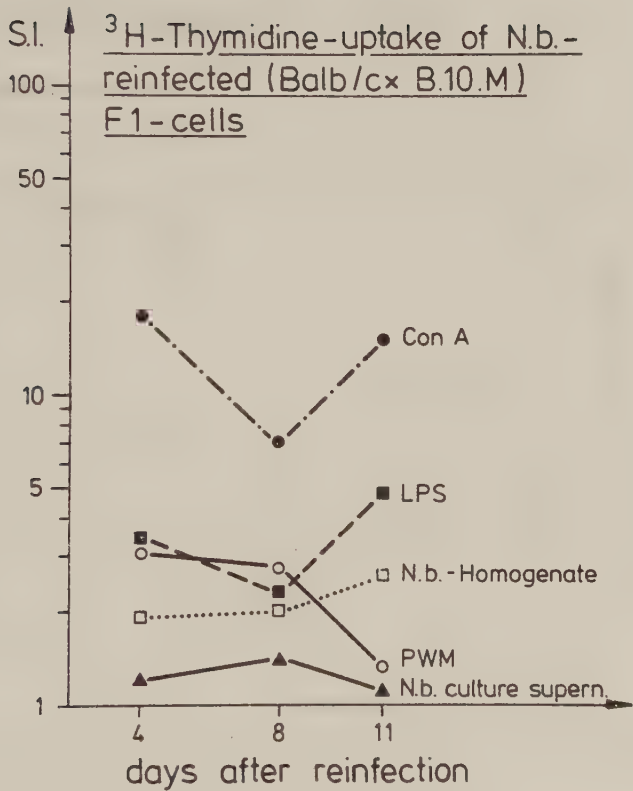


Abb. 32: Lymphozytenproliferation von F1-Hybridmäusen in der N.b.-Reinfektion unter Einfluß von N.b.-Antigen (Homogenat, Kulturüberstand) und Mitogen (PWM, LPS, ConA). S.I. (Stimulationsindex): Quotient aus ^3H -Thymidineinbaurate von Antigen-/Mitogen-stimulierten Zellen und den unbehandelten Kontrollzellen.

IgE-Synthesis of A.CA (not N.b.-infected) mouse cells:
modulation by N.b.-homogenate and N.b.-culture-supernatant

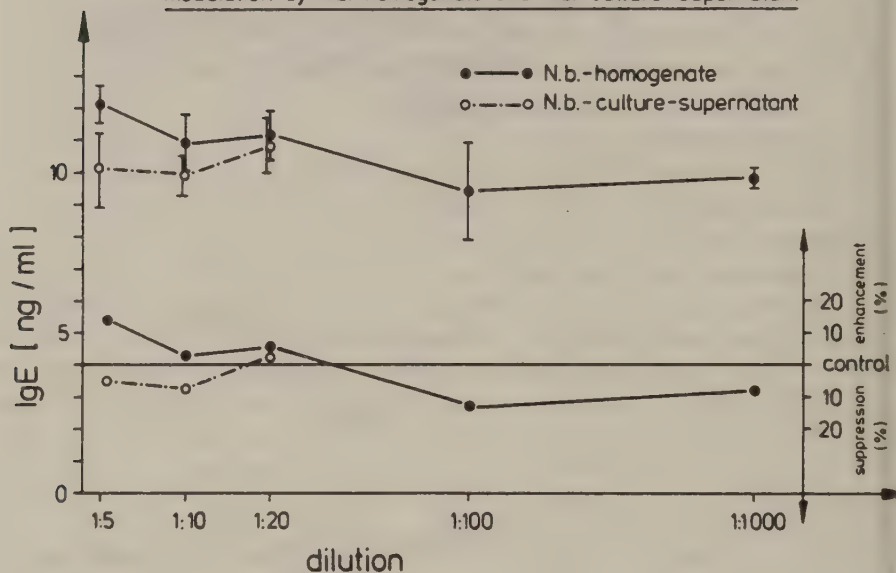


Abb. 33: Einfluß von N.b.-Homogenat und -Kulturüberstand auf die IgE-Synthese nicht infizierter A.CA-Mäuse.

Im oberen Bildteil (linke Ordinate: IgE-Synthese, ng/ml) sind die absoluten Werte der IgE-Produktion unter Antigeneinfluß in Abhängigkeit der verwendeten Verdünnungen (Abszisse: Verdünnung der Antigene) dargestellt.

Im unteren Bildteil (rechte Ordinate: steigernde bzw. inhibitorische Wirkung der Antigene im Vergleich zur Spontansynthese = control) wird die relativierte Antigenwirkung gezeigt.

In Analogie zu den Ergebnissen der IgE-Synthese (Abb. 31) - dort wurde in der Reinfektion durch den N.b.-Kulturüberstand kaum ein Effekt erzielt - zeigt sich auch bei der Lymphozytenproliferation nur eine sehr schwache Wirkung des Kulturüberstandes. Zieht man allerdings zum Vergleich die Wirkung des B-Zellmitogens PWM heran (Abb. 32), zeigt sich, daß auch mit dem Mitogen nur eine verhältnismäßig geringe Stimulationsrate erkennbar ist, die sich am elften Tag nach Reinfektion dem Wert des N.b.-Überstandes annähert und geringer ist als die Einbaurrate der Zellen unter Homogenateinfluß. Dagegen steigt der Stimulationsindex von LPS am elften Tag wieder an. Das gilt ebenso für ConA; bei diesem Mitogen lag ebenfalls am achten Tag nach Reinfektion ein Tiefpunkt der Stimulierbarkeit vor.

D.II.3.3.2. HR-Mäuse

Die Zellen von A.CA-Mäusen wurden unter Einfluß der N.b.-Antigene nur im nicht infizierten Zustand untersucht. Bezüglich der IgE-Synthese ist das Ergebnis in Abbildung 33 dargestellt. Analog zu den mit F1-Mäusen erhaltenen Resultaten bewirkt N.b.-Homogenat (20 µg) bei Zellen nicht infizierter Tiere eine geringe Steigerung der IgE-Synthese (14 %). Dagegen inhibierte der Zusatz von 1 µg die Antikörperbildung um 13 % bzw. 8 %. In Parallelität zu den Zellen der (Balb/c x B10.M) F1-Mäuse supprimiert N.b.-Überstand die IgE-Synthese nicht infizierter Zellen leicht. Die Einflüsse von N.b.-Antigen auf A.CA-Zellen sind aber sehr viel geringer als bei den Zellen der F1-Mäuse (Abb. 31).

Ein Vergleich der Stimulierbarkeit von nicht infizierten HR-Zellen unter dem Einfluß von N.b.-Homogenat bzw. -Kulturüberstand verdeutlicht (Abb. 34), daß die auftretenden Effekte konzentrationsabhängig sind. So supprimiert Homogenatzugabe in einer Konzentration von 1 - 2 µg/ml die Lymphozytentransformation um 15 - 25 %; bei steigender Verdünnung wird dieser Effekt aufgehoben. Dagegen besteht eine starke Inhibition der Proliferation nicht infizierter A.CA-Zellen um 50 % durch Zugabe des Wurmkulturüberstandes (SI = 0,5). Dieser Einfluß wird zwar mit steigender Verdünnung geringer (20 %), bleibt aber bestehen.

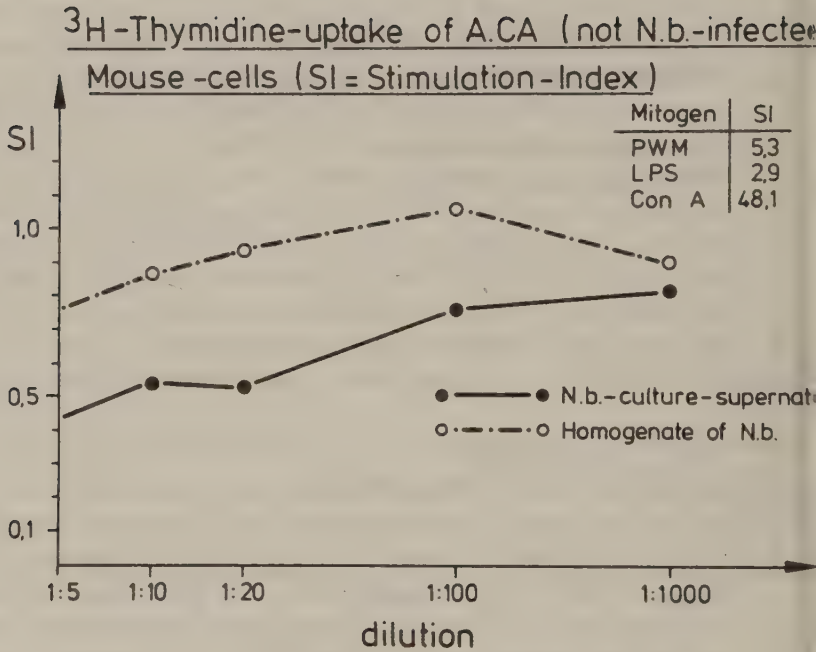


Abb. 34: Stimulation (^3H -Thymidineinbau) von A.CA-Zellen (nicht N.b.-infiziert) unter Antigen- und Mitogeneinfluß.
 Ordinate: Stimulationsindex (vgl. Abb. 32);
 Abszisse: Antigen-/Mitogenverdünnung.

Zum Vergleich sind die Stimulationsindices der Mitogene PWM, LPS und ConA angegeben. Wiederum - vergleicht man die Ergebnisse bei F1-Mäusen (Abb. 32) - bewirken die B-Zell-Mitogene PWM und LPS eine sehr viel geringere Stimulation der Zellen (SI = 5,3 bzw. 2,9) als ConA (SI = 48,1).

D.II.3.3.3. Bestrahlte NR-Mäuse

Die beiden NR-Stämme Balb/c und B10.D2 wurden nach Röntgenbestrahlung (150 R) mit N.b. infiziert bzw. reinfiziert und die IgE-Synthese sowie Lymphozytentransformation unter dem Einfluß von N.b.-Antigenen, wie es schon für die F1-Mäuse beschrieben wurde, untersucht. Es handelt sich wiederum um die Zellen der gleichen Tiere und die gleichen Versuchstage wie bei den Experimenten zum Mitogeneinfluß (D.II.3.2.).

D.II.3.3.3.1. IgE-Synthese unter N.b.-Homogenat-Einfluß

In Abbildung 35 (oberer Teil) sind die beiden Mäusestämme und die Beeinflussung ihrer IgE-Synthese durch N.b.-Homogenat gegenübergestellt. Bei beiden Stämmen supprimiert Homogenatgabe die IgE-Bildung von Zellen nicht N.b.-infizierter Mäuse (15 - 20 % Balb/c; 10 - 38 % B10.D2). Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den bei F1- und A.CA-Mäusen (Abb. 31, Abb. 33) gefundenen Resultaten. Dort kam es zu einer leichten Erhöhung der IgE-Produktion von nicht infizierten Zellen unter Homogenateinfluß.

Am siebten Tag nach Infektion zeigen beide bestrahlten Mäusestämme eine Steigerung der IgE-Synthese nach Homogenatgabe (18 % Balb/c; 35 % B10.D2). In der Reinfektion wird die IgE-Produktion der Balb/c-Zellen nicht beeinflusst. Die Homogenatkonzentration von 1 µg/ml führt dagegen bei B10.D2-Zellen zu einer Steigerung von 24 % bzw. 18 %.

D.II.3.3.3.2. IgE-Synthese unter dem Einfluß von N.b.-Kulturüberstand

Die Wirkung des N.b.-Kulturüberstandes auf die IgE-Synthese der Zellen bestrahlter NR-Tiere verläuft fast parallel zu der des Homogenats (Abb. 35, unterer Teil). Bei Zellen nicht N.b.-

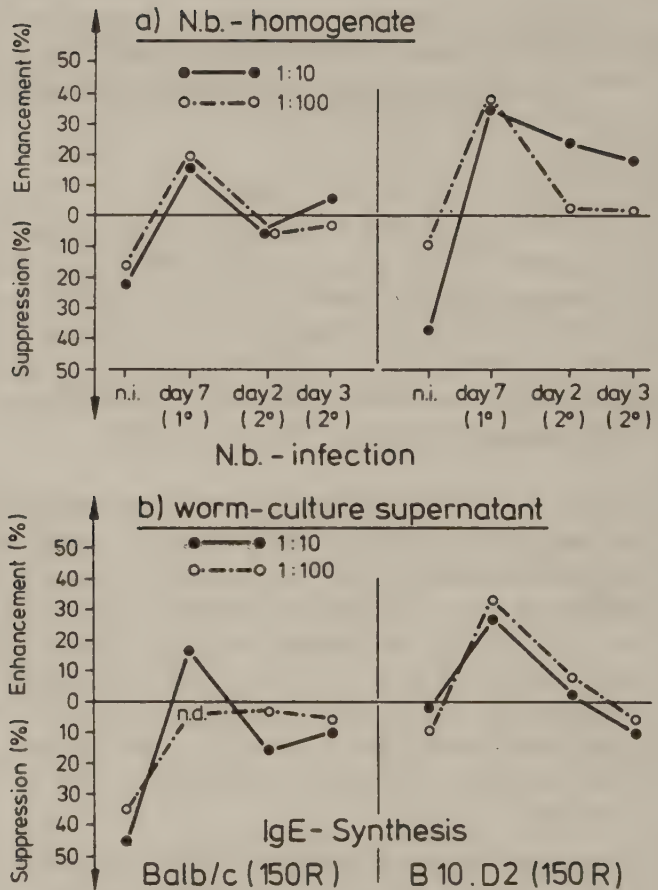


Abb. 35: Einfluß von N.b.-Homogenat (a) und Wurm-Kulturüberstand (b) auf die IgE-Synthese von bestrahlten (150 R) Balb/c- und B10.D2-Mäusen im Infektionsverlauf mit N.b.

Dargestellt ist die modulierende Wirkung der Antigene (Ordinate: % Suppression, % Enhancement) in Bezug auf die Spontan-IgE-Synthese (Modulation 0 %).

infizierter Mäuse kommt es (Balb/c) zu einer erheblichen Suppression der IgE-Synthese (35 - 45 %); diese ist noch ausgeprägter als bei den F1- bzw. A.CA-Mäusen (Abb. 31, Abb. 33). Dagegen wird die IgE-Synthese von B10.D2-Zellen nicht beeinflusst.

Am siebten Tag nach Infektion wird die IgE-Produktion von Balb/c-Zellen leicht erhöht (16 %), bei B10.D2 steigt sie auch an (27 - 33 %). Dies ist vergleichbar mit der Steigerung, die durch Homogenatzugabe (Abb. 35, oberer Teil) zu beobachten war. Eine ähnliche Erhöhung der IgE-Synthese wurde durch Zusatz von N.b.-Kulturüberstand auch am 14. Tag nach Infektion bei F1-Mäusen erzielt (Abb. 31). Zu Beginn der Reinfektion sind dagegen keine signifikanten Effekte durch die Zugabe von Kulturüberstand zu erreichen (Abb. 35).

D.II.3.3.3.3. Vergleich von IgE-Synthese und Lymphozytentransformation unter N.b.-Antigen-Einfluß

Vergleicht man die IgE-Synthese und die Lymphozytentransformation der Zellen von Balb/c-Mäusen, so fällt auf (Abb. 36), daß auch die Proliferationsrate von nicht infizierten Zellen um 20 % (Homogenat) bzw. 60 % (N.b.-Kulturüberstand) supprimiert wird. Es liegt eine Parallelität zur Suppression der IgE-Synthese vor (Abb. 35). Die IgE-Synthese wird nach dem siebten Tag der Infektion durch N.b.-Antigene nicht mehr beeinflusst, dagegen steigt die Stimulierbarkeit der Zellen durch Homogenat bzw. Kulturüberstand noch bis zum dritten Tag nach Reinfektion an und fällt erst danach ab.

Andere Ergebnisse wurden mit B10.D2-Zellen erhalten (Abb. 37). Die Stimulierbarkeit dieser Zellen wird im nicht infizierten Zustand um 10 % (Homogenat) bzw. 60 % (N.b.-Kulturüberstand) supprimiert. Ein entgegengesetztes Resultat wurde bei der Hemmung der IgE-Synthese gefunden (Abb. 35). Dort hatte Homogenatzugabe einen stärkeren supprimierenden Einfluß als der Kulturüberstand. Wie bei Balb/c (Abb. 36), so steigt auch bei Lymphozyten von B10.D2 die Stimulierbarkeit der Zellen in der Infektion bis zum sechsten Tag nach Reinfektion weiter an.

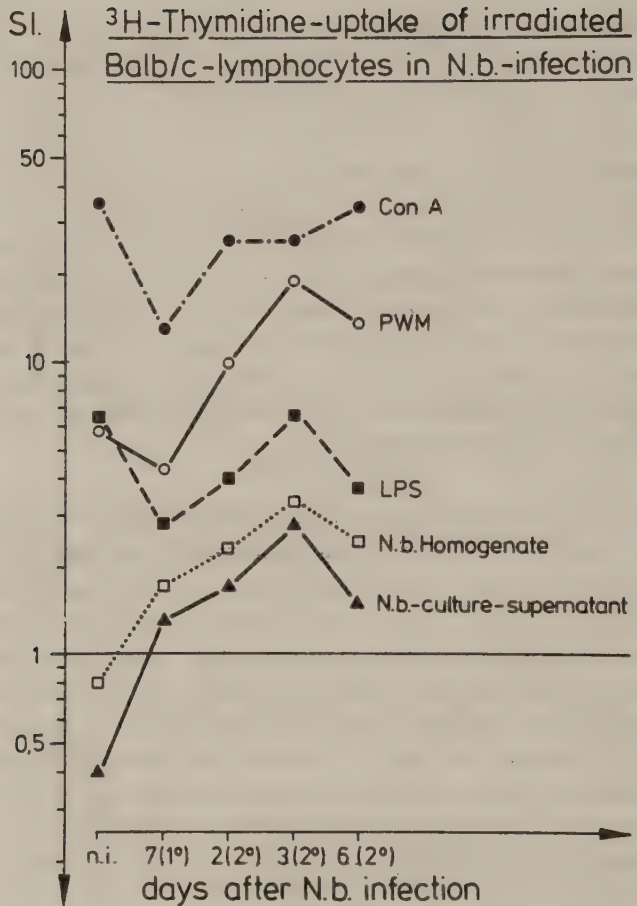


Abb. 36: Lymphozytenproliferation von bestrahlten (150 R) Balb/c-Zellen unter Einfluß von N.b.-Antigenen und Mitogenen.
 Ordinate: Stimulationsindex (vgl. Abb. 32);
 Abszisse: Zeitpunkt in der N.b.-Infektion;
 n.i. = nicht infiziert;
 1° = Erstinfektion, 2° = Reinfektion.

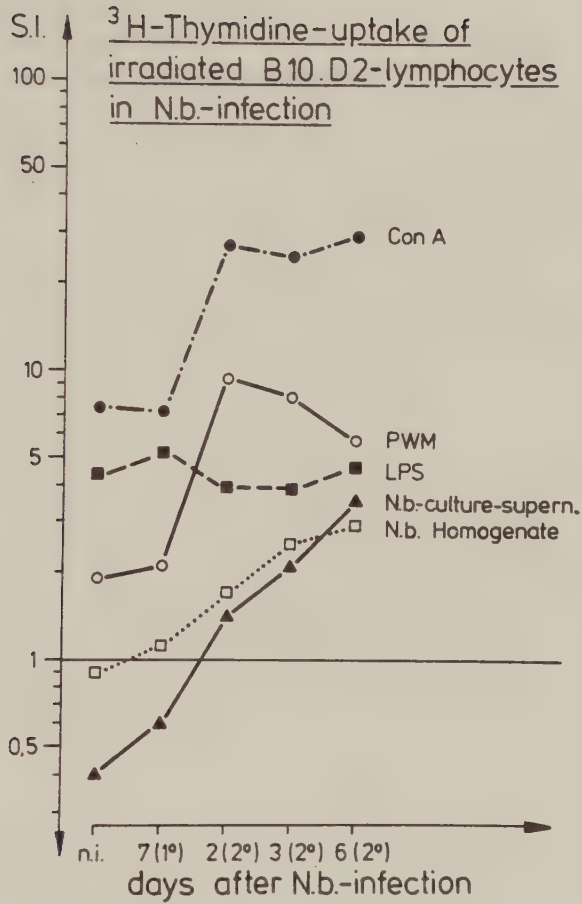


Abb. 37: ^3H -Thymidineinbau von bestrahlten (150 R) B10.D2-Zellen (Antigen- und Mitogeneinfluß).

Legende vgl. Abb. 36.

Dagegen traten in der IgE-Synthese nach dem fördernden Effekt am siebten Tag nach Infektion in der Reinfektion nur noch geringe Effekte bei Homogenat- bzw. Kulturüberstandzugabe auf (Abb. 35).

Der Vergleich mit den stimulierenden Einflüssen der Mitogene PWM, LPS und ConA zeigt, daß diese am siebten Tag nach Infektion einen Rückgang des Stimulationseffektes zeigen (Balb/c, Abb. 36) bzw. noch im Tiefpunkt ihrer Wirkung liegen (B10.D2, Abb. 37). Nach einem Anstieg der Mitogenstimulation zu Beginn der Reinfektion bzw. Verharren auf einem gleichbleibenden Level (LPS, B10.D2-Zellen) fällt die Stimulationswirkung von PWM und LPS ab; die Stimulierung durch ConA bleibt dagegen konstant.

D.II.3.3.4. Zusammenfassung

In den Experimenten wurde der Einfluß von N.b.-Antigen in Form eines parasitären Proteins (Homogenat adulter Würmer) und eines Überstandes der Kultur von adulten Würmern auf die IgE-Synthese verschiedener Mäusezellen untersucht. Es zeigte sich, daß Homogenat die IgE-Synthese von Zellen nicht N.b.-infizierter Mäuse sowohl steigern kann (F1-Hybridzellen; A.CA) als auch zu einer Suppression der IgE-Produktion führt (bestrahlte Balb/c bzw. B10.D2). Ebenfalls steigt die IgE-Synthese unter Homogenateinfluß am Beginn der Reinfektion (F1-Mäuse) bzw. eine Woche nach N.b.-Infektion (bestrahlte NR-Mäuse).

Auf die Lymphozytentransformation wirkt Homogenatzugabe sowohl suppressiv bei nicht infizierten Zellen (bestrahlte Balb/c, B10.D2; A.CA) als auch schwach stimulierend (F1-Tiere). Im Verlauf der Infektion wird die Stimulierbarkeit der Zellen durch Homogenat und Kulturüberstand leicht gesteigert (Ausnahme: A.CA).

Kulturüberstand hat auf die IgE-Synthese nicht infizierter Mäusezellen supprimierende Wirkung, in der Infektion führt Zugabe des N.b.-Überstandes zu einer Steigerung der IgE-Synthese; in der Reinfektion wird kein Einfluß sichtbar; die Stimulation der Lymphozytentransformation durch N.b.-Homogenat bzw. -Kulturüberstand ist deutlich geringer als die durch B- und T-Zell-Mitogene (PWM, LPS, ConA).

D.II.3.4. Die Modulation der IgE-Synthese durch Serum

Bei der Untersuchung der spezifischen IgE-Antwort in vivo hatte sich deutlich gezeigt (Kap. D.I.1.2.), daß die Behandlung von Mäusen mit Serum zu einer Modulation der spezifischen IgE-Antikörperproduktion gegen N.b. führte. Damit stellte sich die Frage, ob lösliche Serumfaktoren, wie sie in der Einleitung beschrieben wurden (Kap. B.3.3.2.) oder andere Mechanismen für diese Ergebnisse verantwortlich sind. Gleichmaßen sollte eine Überprüfung der Befunde in vitro stattfinden, um weitere Aufschlüsse über die Regulation der IgE-Antikörperproduktion zu erhalten.

Daher wurde untersucht, welche Wirkung die Zugabe verschiedener Mäuseseren in vitro auf die IgE-Synthese hat. Die Zellen dieser Versuche stammten wiederum von den gleichen Mäusen ((Balb/c x B10.M) F1, A.CA, bestrahlte Balb/c bzw. B10.D2), mit denen die Experimente zur Wirkung von Mitogenen im Infektionszyklus ausgeführt worden waren (Kap. D.II.3.2. bzw. D.II.3.3.). Es wurden drei verschiedene Mäuseseren ausgetestet. Sie wurden von Stämmen, die sich bezüglich der spezifischen IgE-Antwort gegen N.b. unterscheiden, gewonnen. Nicht N.b.-infizierte A.CA (HR)-, B10.G (LR)- und Balb/c (NR)-Mäuse wurden geblutet, das Serum sterilfiltriert und jeweils 100 µl in verschiedenen Verdünnungen den Kulturansätzen zugefügt. Nach sieben Tagen wurde dann der IgE-Gehalt des zellfreien Kulturüberstandes im RIA bestimmt und mit dem Kontrollwert der Spontansynthese, d. h. der IgE-Produktion von Zellen, denen 100 µl Medium zugesetzt wurde, verglichen.

D.II.3.4.1. Der Einfluß verschiedener Mäuseseren auf die in vitro IgE-Synthese von Zellen aus der N.b.-Infektion

D.II.3.4.1.1. B10.G-Serum

Dieses Serum wurde im ersten Experiment den Zellen von (Balb/c x B10.M) F1-Mäusen zugesetzt und seine Wirkung auf die IgE-Synthese von Zellen, die an verschiedenen Tagen des Infektionszyklus entnommen wurden, getestet. Das Serum wurde in Konzentrationen von 0,3 %, 0,03 % und 0,003 % eingesetzt (Abb. 38).

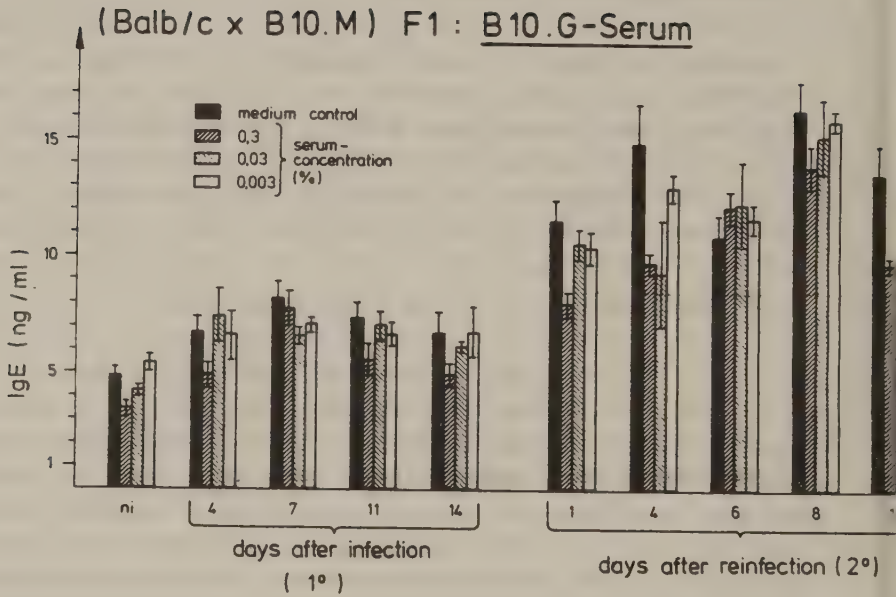


Abb. 38: Einfluß von B10.G-Serum auf die IgE-Synthese von (Balb/c x B10.M) F1-Zellen.

Ordinate: IgE-Produktion (ng/ml)

Abszisse: N.b.-Infektionszyklus,

n. i. = nicht infiziert

medium control = Spontansynthese

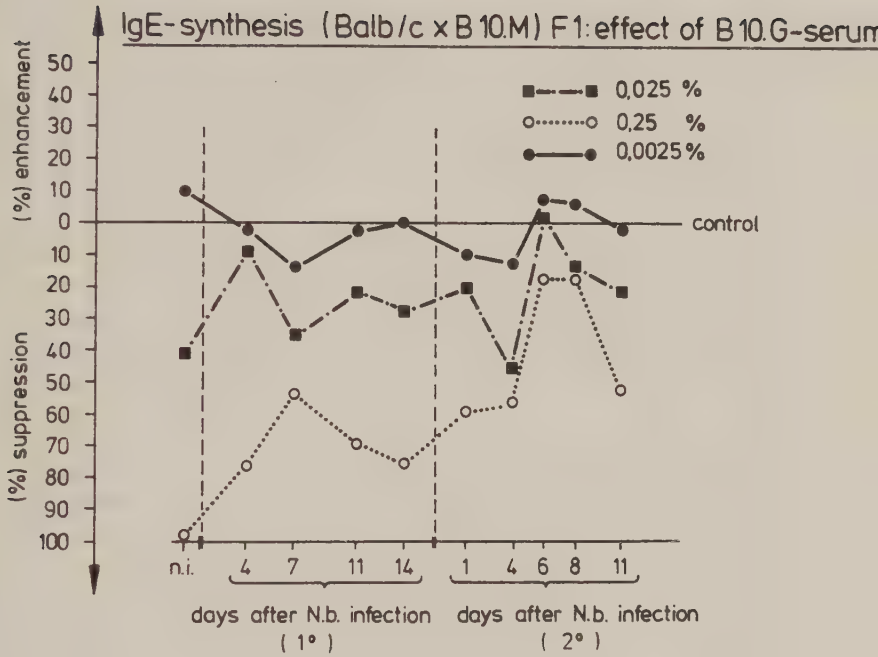


Abb. 39: Suppression der Spontan-IgE-Synthese (= control) durch Zusatz von B10.G-Serum.
Testzellen: F1-Hybridmäuse (vgl. Abb. 38).

Es zeigt sich eine konzentrationsabhängige Inhibition der IgE-Synthese. Der Zusatz von B10.G-Serum (0,3 %) führt zu allen Zeiten der N.b.-Infektion bzw. Reinfektion sowie bei Zellen von nicht infizierten Mäusen zu einer Suppression der IgE-Produktion im Vergleich zum Kontrollwert. Eine Ausnahme bilden lediglich der siebte Tag nach Infektion und der sechste Tag nach Reinfektion. LR-Serum in geringeren Konzentrationen übt eine schwächere Wirkung auf die IgE-Synthese aus.

Bei der Darstellung dieser absoluten IgE-Werte im Kulturüberstand ist allerdings ein Faktor nicht berücksichtigt, der bei Versuchen zum Einfluß von Serum nicht vernachlässigt werden darf. Im Mäuseserum auch nicht N.b.-infizierter Tiere ist bereits IgE vorhanden (vgl. Kap. D.I.2.1.1.). Der Zusatz von Serum in die Kultur hat auch gleichzeitig das Einbringen von IgE zur Folge.

Das B10.G-Serum enthielt in 100 µl 3,3 ng IgE (0,3 %iges Serum) und 1,3 ng IgE (0,03 %iges Serum); bei weiterer Verdünnung war kein IgE nachweisbar. Subtrahiert man nun diese Werte von den absolut erhaltenen IgE-Mengen, ergibt sich ein deutliches Bild der suppressiven Wirkung dieses Serums (Abb. 39). Die IgE-Synthese nicht N.b.-infizierter Zellen wird nahezu 100 %ig inhibiert. Im Verlauf der Infektion und an den ersten Tagen der Reinfektion schwankt die Suppression zwischen 50 % und 80 %; sie geht am sechsten und achten Tag der Zweitinfektion auf 20 % zurück und steigt wieder auf 50 % am elften Tag an. Eine geringere Serum-Konzentration (0,03 %) bewirkt eine verminderte Suppression bzw. hat keine Wirkung (0,003 %iges Serum) auf die IgE-Synthese.

Der Einfluß von B10.G-Serum wurde auch auf die IgE-Produktion der Zellen anderer Mäusestämme untersucht. Diese Ergebnisse sind tabellarisch zusammengefaßt (Tab. 17). Beim Vergleich mit den Versuchen der F1-Mäuse (Abb. 39) zeigt sich, daß die Wirkung von B10.G-Serum auf die IgE-Synthese anderer Mäusestämme geringer ausfällt. Mit 0,3 %igem LR-Serum ist nur bei nicht infizierten Balb/c-Zellen sowie A.CA-Zellen am zehnten Tag nach Infektion eine 50 %ige Suppression der IgE-Synthese zu erreichen. Dieser Inhibitionswert war im Infektionszyklus

B 10.G- SERUM	A.CA - CELLS			BALB / c (150 R) - CELLS				B 10.D2 (150 R) - CELLS			
	N.I.	DAY 6,1°	DAY 10,1°	N.I.	DAY 7,1°	DAY 2,2°	DAY 3,2°	N.I.	DAY 7,1°	DAY 2,2°	DAY 3,2°
0.3 %	-36	-30	-50	-50	-31	-21	-28	-30	-15	-34	-33
0.03 %	- 7	-10	-29	+13	N.D.	-16	- 4	+ 1	+ 2	- 5	-25
0.003 %	+ 7	+10	-11	+17	+ 4	- 8	- 3	+ 6	+ 2	-14	- 7

Tab. 17: Einfluß von B10.G-Serum auf die IgE-Synthese von Zellen verschiedener Mäusestämme.

+, -: steigernde bzw. inhibierende Wirkung (%) auf die IgE-Produktion im Vergleich zur Kontrolle (= Spontansynthese); N.I. = nicht infiziert, 1° Erstinfektion, 2° = Reinfektion mit N.b.

BALB / c - SERUM	A.CA - CELLS			BALB / c - CELLS (150 R)		B 10.D2 - CELLS (150 R)	
	N.I.	DAY 6,1°	DAY 10,1°	DAY 2,2°	DAY 3,2°	DAY 2,2°	DAY 3,2°
1 %	62	60	89	82	89	74	100
0,1 %	25	37	55	44	52	38	68
0.01 %	6	3	30	19	31	15	44

Tab. 18: IgE-Synthese unter dem Einfluß von Balb/c-Serum: inhibitorische Wirkung (% Suppression im Vergleich zur Spontansynthese) des Mäuseserums auf Zellen verschiedener Mäusestämme an unterschiedlichen Tagen der Infektion.

N.I. = nicht infiziert, 1° = Erstinfektion, 2° = Reinfektion

bei F1-Mäusen mit der gleichen Serumkonzentration die Regel. In den anderen Experimenten (oberste Spalte) schwankt die Suppression der IgE-Produktion durch B10.G-Serum (0,3 %) zwischen 15 % und 30 %; dies entspricht der Wirkung von 0,03 %igem Serum auf F1-Mäuse (Abb. 39).

Die beiden anderen untersuchten Serumkonzentrationen haben auf die getesteten Mäusezellen keinen Einfluß (0,003 %) bzw. supprimieren die IgE-Synthese nur sporadisch (0,03 %: A.CA, 10. Tag nach Infektion; B10.D2, 3. Tag nach Reinfektion).

D.II.3.4.1.2. Balb/c-Serum

Serum von Balb/c-Mäusen wurde in Konzentrationen von 1 %, 0,1 % und 0,01 % auf seinen Einfluß bezüglich der IgE-Synthese kultivierter Zellen untersucht. Nach Abzug der Werte für das im Serum vorhandene IgE (6,8 ng, 4,3 ng, 1,6 ng) wurden die in Tabelle 18 zusammengefaßten Ergebnisse (Suppression der IgE-Synthese) erhalten.

Bei allen verwendeten Zellen (A.CA, bestrahlte Balb/c bzw. B10.D2) ist eine starke Inhibition (80 - 100 %) der IgE-Produktion durch Zugabe von 1 % Balb/c-Serum zu beobachten. Die Suppression tritt an allen untersuchten Tagen einer N.b.-Infektion bzw. -Reinfektion auf; sie ist bei nicht N.b.-infizierten A.CA-Zellen und Zellen dieser Mäuse am siebten Tag nach Infektion am geringsten (62 % bzw. 60 %).

Eine Verringerung der Serumkonzentration auf ein Zehntel (mittlere Spalte: 0,1 %) führt zu einer Reduktion des ausgeübten Effektes um knapp die Hälfte (Faktor 1,8). Die Inhibitionswerte von 0,1 %igem Balb/c-Serum liegen in dem Bereich, der auch von B10.G-Serum in einer Konzentration von 0,3 % bei F1-Mäusen in der N.b.-Infektion erreicht wurde (Abb. 39). Auch 0,01 %iges Balb/c-Serum ist in der Lage, die IgE-Synthese in verschiedenen Fällen erheblich zu supprimieren (A.CA, 10. Tag nach N.b.-Infektion: 30 %; Balb/c, 3. Tag nach Reinfektion: 31 %; B10.D2, 3. Tag nach Reinfektion: 44 %).

A.CA : suppression of IgE - synthesis by mouse - sera

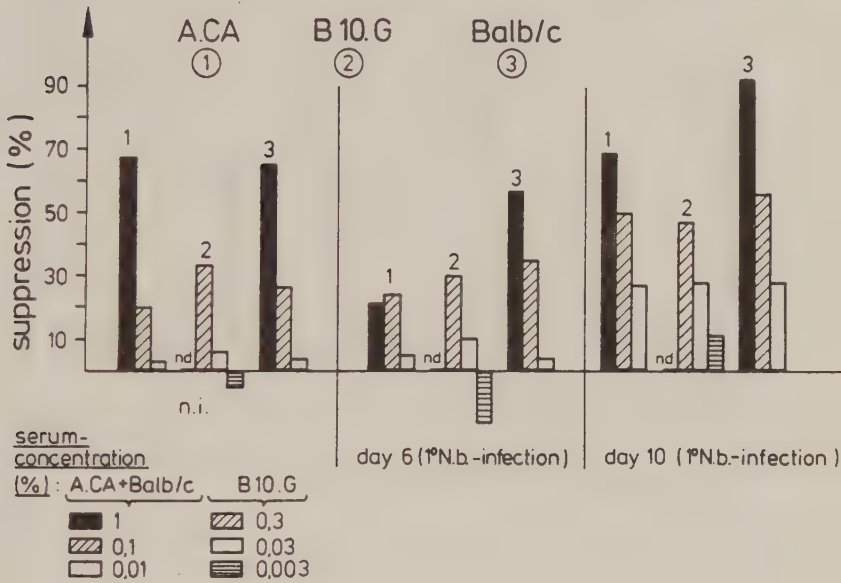


Abb. 40: Suppression der IgE-Synthese von A.CA-Zellen durch Zusatz verschiedener Mäuseseren. Die Mäuseseren (1: A.CA, 2: B10.G, 3: Balb/c) wurden den Zellen in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt (vgl. Legende unter der Graphik).

D.II.3.4.2. Vergleich des Einflusses verschiedener Mäuseren auf die IgE-Synthese und Stimulierbarkeit von A.CA-Zellen

Wurde bisher der Einfluß von B10.G (LR)- und Balb/c (NR)-Serum auf die IgE-Synthese verschiedener Mäusezellen dargestellt, so werden die Wirkungen dieser beiden Seren nun mit einem dritten - A.CA (HR)-Serum - verglichen. Diese Untersuchungen wurden mit Zellen von A.CA-Mäusen durchgeführt; mit Lymphozyten von nicht N.b.-infizierten Mäusen sowie Zellen, die am sechsten bzw. zehnten Tag nach N.b.-Infektion entnommen wurden.

In Abbildung 40 ist die Suppression der IgE-Synthese durch die drei genannten Mäuseren zusammengefaßt. Wie schon gezeigt wurde (Tab. 17), supprimiert 0,3 %iges B10.G-Serum die IgE-Produktion von A.CA-Zellen (30 - 50 %); das gleiche Serum (0,03 %ig) übt nur am zehnten Tag nach Infektion (29 %) einen suppressiven Effekt aus. Für Balb/c-Serum gilt (Tab. 18), daß es in einer Konzentration von 1 % die IgE-Bildung um 60 - 90 % supprimieren kann; 0,1 %iges Balb/c-Serum zeigt die gleichen Effekte wie das 0,3 %ige B10.G-Serum.

In Abbildung 40 wird nun deutlich, daß auch homologes A.CA (HR)-Serum in der Lage ist, die IgE-Synthese von Zellen des gleichen Mäusestammes zu supprimieren. Bei Zusatz von 1 %igem Serum kommt es zu einer Inhibition von 67 - 69 % (nicht infizierte Zellen bzw. 10. Tag nach Reinfektion). Dagegen erreicht die Suppression am sechsten Tag nach Infektion nur einen Wert von 21 % und wird von der inhibitorischen Wirkung des 0,1 %igen Serums übertroffen (24 %). Diese Serumverdünnung supprimiert die IgE-Synthese geringfügig weniger als Balb/c-Serum der gleichen Konzentration.

Zusatz von 0,01 % A.CA-Serum zeigt bei Zellen nicht infizierter Tiere bzw. am sechsten Tag nach Infektion keine Wirkung; dagegen fällt der supprimierende Effekt (27 %) dieser Konzentration am zehnten Infektionstag auf. An diesem Zeitpunkt wird die IgE-Produktion auch von 0,01 %igem Balb/c-Serum und B10.G-Serum in einer Konzentration von 0,3 % um 27 % inhibiert.

A.CA: suppression of ^3H -thymidine-uptake by different mouse-sera

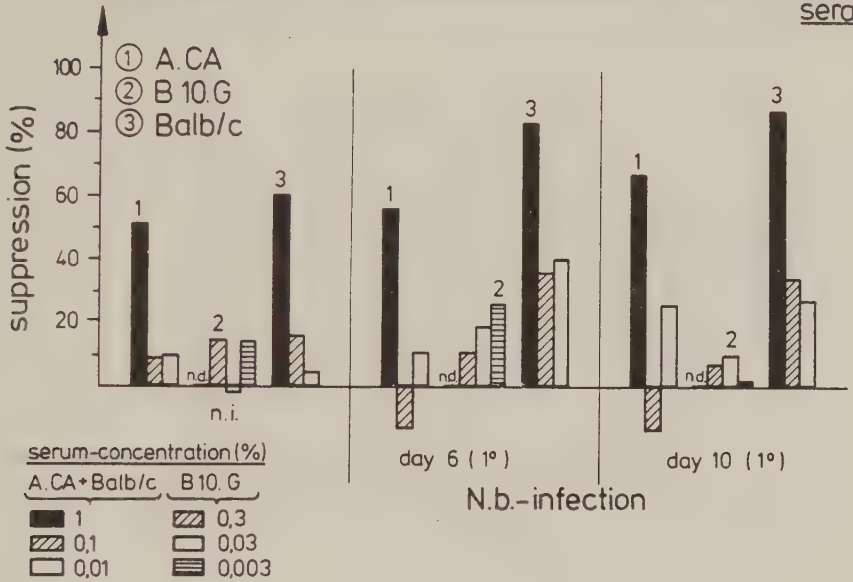


Abb. 41: Suppression der Lymphozytenproliferation von A.CA-Zellen durch Zusatz verschiedener Mäuseren (vgl. Abb. 40).

Die Lymphozytenproliferation von A.CA-Zellen (Abb. 41) wird dagegen von B10.G-Serum nicht inhibiert (sieht man von der 19 %igen bzw. 26 %igen Suppression durch 0,03 % bzw. 0,003 % Serum ab). Auch 0,1 %iges A.CA-Serum hat keinen Einfluß. Im Gegensatz dazu kommt es durch Zusatz von 1 %igem Serum zu einer erheblichen Suppression (55 %) am sechsten Tag nach Infektion; an diesem Zeitpunkt wurde die IgE-Synthese von der gleichen Serumkonzentration nur zu 20 % inhibiert (Abb. 40). Andererseits ist A.CA-Serum in einer Konzentration von 0,01 % nur am zehnten Tag nach Infektion in der Lage, die Lymphozytentransformation in Parallelität zur IgE-Synthese um 25 % zu supprimieren.

Dagegen verlaufen die Suppression von IgE-Synthese und Lymphozytentransformation durch Balb/c-Serum nahezu identisch. Es besteht nur ein Unterschied: 0,01 %iges Serum inhibiert die Proliferation um 40 %, hat aber keinen Einfluß auf die IgE-Synthese.

Die verschiedenen Seren zeigten also Unterschiede in ihrer suppressiven Wirkung auf die IgE-Synthese und Lymphozytentransformation. Diese Verschiedenheiten waren auch abhängig vom Zeitpunkt der N.b.-Infektion.

D.II.3.4.3. Der Einfluß von Fötalem Kälberserum (FCS) auf die IgE-Synthese

Wie in den vorausgehenden Kapiteln gezeigt wurde, supprimierten die untersuchten Mäuseseren sowohl die IgE-Synthese als auch die Lymphozytentransformation verschiedenster Zellen aus dem N.b.-Infektionszyklus. Dabei war auch eine Konzentrationsabhängigkeit festzustellen. Nun sollte die Frage geklärt werden, ob diese Suppression vielleicht ein genereller Effekt bei der Zugabe von Serum ist.

Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde die IgE-Synthese verschiedener Mäusezellen unter dem Einfluß von FCS getestet. Den Zellen wurden also zusätzlich zu dem schon im Kulturmedium vorhandenen Serumanteil (10 %, vgl. Kap. C:I.4.) verschiedene Konzentrationen an FCS zugesetzt: 10 %, 1 % und 0,1 %. Es wurde in diesen Experimenten festgestellt (Abb. 42), daß die IgE-

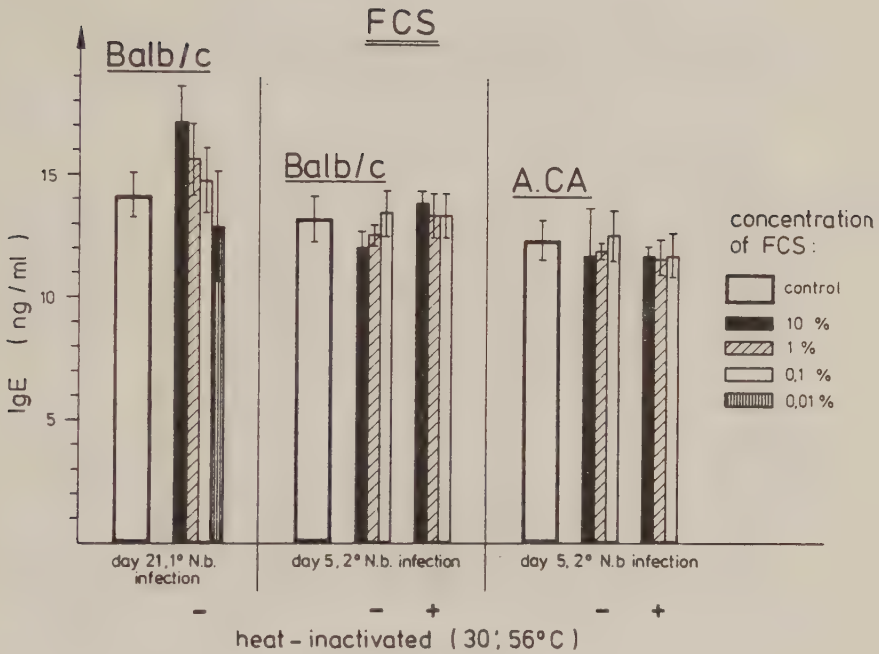


Abb. 42: Einfluß von FCS auf die IgE-Synthese (ng/ml) von Balb/c-Zellen (21. Tag N.b.-Infektion), Balb/c-Zellen (5. Tag Reinfektion) und A.CA-Zellen (5. Tag Reinfektion). Das FCS wurde in einigen Versuchen (+) vorher hitzeinaktiviert (30 min., 50° C).

Synthese von Balb/c-Zellen (entnommen am 21. Tag nach N.b.-Infektion bzw. 5. Tag nach Reinfektion) sowie A.CA-Mäusezellen (5. Tag nach Reinfektion) durch FCS-Zugabe nicht supprimiert wurde. Dabei war es unerheblich, ob das Serum hitzeinaktiviert war (30 min., 56° C) oder nicht. Bei infizierten Balb/c-Zellen führte die Zugabe von 1 % bzw. 10 % FCS sogar zu einer Steigerung der IgE-Produktion.

Dagegen zeigte sich bei parallel durchgeführten Untersuchungen der Lymphozytentransformation, daß diese durch FCS-Zusatz im Mittel um 18 % ($\pm$ 7 %) supprimiert wurde. Somit muß davon ausgegangen werden, daß Inhibitionseffekte der Lymphozytenproliferation durch Serum, die geringer als 25 % sind, auf unspezifische Ursachen zurückzuführen sind.

D.II.3.4.4. Fraktionierung von Mäuseseren und der Einfluß dieser Serumfraktionen auf die IgE-Synthese und Lymphozytentransformation

Wie gezeigt wurde (Kap. D.II.3.4.1. und D.II.3.4.2.) wirken in vitro verschiedene Mäuseseren suppressiv auf die IgE-Synthese und Lymphozytentransformation von Milz- und mesenterialen Lymphknotenzellen verschiedener Mäusestämme. Als nächster Schritt schlossen sich daher weitere Experimente an, die Aufschlüsse über die Ursachen dieser suppressiven Eigenschaften der Seren liefern sollten.

Eine gebräuchliche Methode zur groben Auftrennung von Serumproteinen ist eine Präzipitation der Seren mit Ammoniumsulfat: die Serumproteine fallen bei charakteristischen Salzkonzentrationen aus. Die Trennung der Serumproteine von drei Mäuseseren (Balb/c, B10.G, B10.D2) wurde durch 0 - 33 %ige, 33 - 50 %ige und 50 - 70 %ige Sättigung jedes Serums durchgeführt (Kap. C.II.15.). Die Präzipitate wurden nach Dialyse gegen PBS-Puffer sterilfiltriert, in Kulturmedium (ohne FCS-Zusatz) verdünnt und den kultivierten Mäusezellen zugesetzt.

A.CA (n.i.) : fractions of mouse-sera

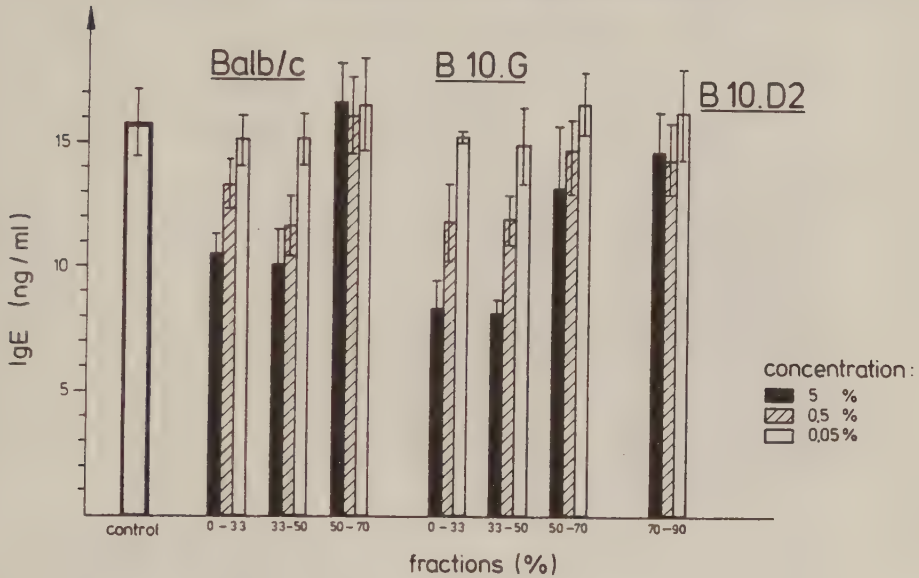


Abb. 43: Die IgE-Synthese nicht infizierter A.CA-Zellen unter dem Einfluß von Serumfraktionen verschiedener Mäuseseren (0 - 33 %, 33 % - 50 %, 50 % - 70 %, 70 % - 90 % Ammoniumsulfatpräzipitate). Die Serumfraktionen wurden den Zellen in Konzentrationen von 5 %, 0,5 % und 0,05 % zugesetzt (control = Spontansynthese).

D.II.3.4.4.1. Die Produktion von IgE unter dem Einfluß
von Serumfraktionen

Die Wirkung der Serumfraktionen auf die IgE-Synthese wurde mit Zellen von A.CA (HR)-Mäusen und Balb/c (NR)-Mäusen untersucht. Von beiden Stämmen wurden Lymphozyten nicht N.b.-infizierter Mäuse und von Tieren am fünften Tag nach Reinfektion gewonnen. Im Verlauf der Erstinfektion wurden Zellen des elften Tages (A.CA) und des 21. Tages (Balb/c) auf ihre IgE-Synthese unter dem Einfluß von Serumproteinen untersucht.

In Abbildung 43 ist das in allen sechs Experimenten erhaltene, charakteristische Ergebnis am Beispiel von nicht N.b.-infizierten A.CA-Mäusen dargestellt. Die IgE-Synthese wird deutlich supprimiert, wenn die 0 - 33 %- und 33 - 50 %-Präzipitatfraktionen von Balb/c- bzw. B10.G-Serum den kultivierten Zellen in Konzentrationen von 5 % bzw. 0,5 % zugesetzt werden. Eine weniger starke suppressive Wirkung zeigt die 50 - 70 %-Fraktion von B10.G-Serum (Zusatz von 5 %). Die gleiche Präzipitatfraktion von Balb/c-Serum sowie Zusatz von 0,05 % der anderen Präzipitate inhibieren die IgE-Synthese der A.CA-Zellen nicht.

Ein zweites Experiment zu diesem Komplex ist in Abbildung 44 dargestellt. Die Wirkung der Serumfraktionen wurde hierbei auf die Zellen von Balb/c-Mäusen am fünften Tag nach der Reinfektion getestet. In diesem Experiment wurden auch die Präzipitatfraktionen von B10.D2-Serum verwendet. Auch hier zeigt sich, daß nur die 0 - 33 %- bzw. 33 - 50 %-Präzipitate (bei Zusatz in Konzentrationen von 5 % bzw. 0,5 %) aller Mäuseseren die IgE-Synthese supprimieren. Ohne Einfluß bleiben dagegen die 50 - 70 %- bzw. 70 - 90 %-Präzipitate (B10.D2-Serum). Der Zusatz dieser Fraktionen führt zu gleichen Werten der IgE-Bildung wie bei der Kontrollgruppe unbehandelter Zellen (Spontansynthese).

Die gleichen Ergebnisse - Suppression der IgE-Synthese durch die 0 - 33 %- und 33 - 50 %-Präzipitate dreier Mäuseseren - wurden auch in den anderen vier, hier nicht dargestellte, Experimenten erhalten (A.CA: Zellen 11. Tag Infektion, 5. Tag Reinfektion; Balb/c: Zellen 21. Tag Infektion bzw. nicht N.b.-infiziert).

Balb/c (day 5, 2° N.b.-infection): fractions of mouse-serum

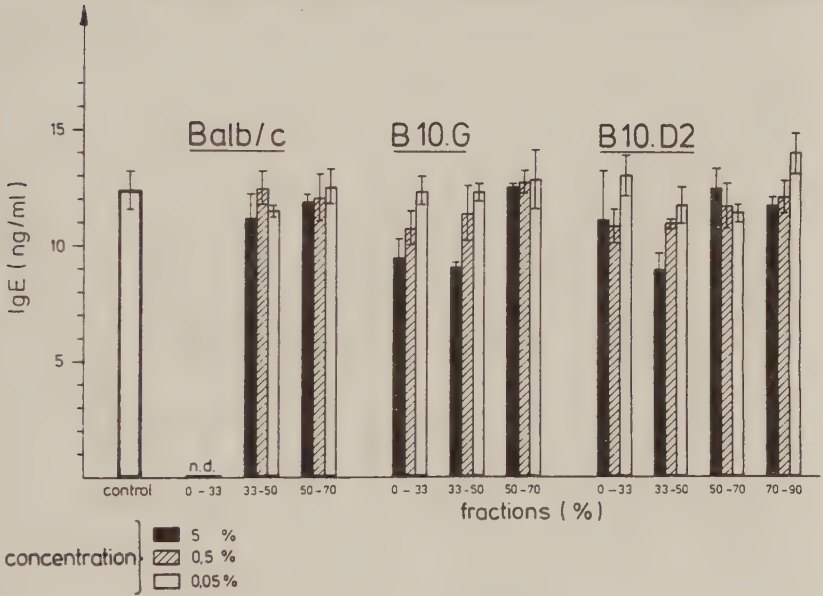


Abb. 44: IgE-Synthese reinfizierter Balb/c-Zellen unter Einfluß von Serumfraktionen verschiedener Mäuseren (vgl. Abb. 43).

D.II.3.4.4.2. Vergleich der Suppression von IgE-Synthese und Lymphozytentransformation durch Serumfraktionen

Bei der Untersuchung der IgE-Synthese unter dem Einfluß von Mäuseseren wurde schon darauf hingewiesen (D.II.3.4.1.), daß im Serum IgE enthalten ist, welches nicht von den kultivierten Zellen produziert wurde sondern mit dem Serum in die Kulturen eingeführt wurde.

Die Ammoniumsulfatpräzipitation fällt das Serum-IgE in den 0 - 33 %- und 33 - 50 %-Fraktionen aus. In den Abbildungen 43 und 44 sind die absoluten Werte des in der Kultur nach sieben Tagen gemessenen IgE dargestellt. Um die Wirkung der Serumfraktionen exakt vergleichen zu können - bei Zusatz einer geringen Konzentration wurde weniger IgE in die Kultur eingebracht als durch höher konzentrierte Serumfraktionen -, mußten daher die Werte des nicht in der Kultur produzierten IgE von den Absolutwerten subtrahiert werden. Dies wurde ausgeführt, bevor die Stärke der Suppression - ausgedrückt in Prozent im Vergleich zur Spontansynthese - berechnet wurde. In Tabelle 19 ist die Inhibition der IgE-Synthese durch Serumfraktionen in den sechs durchgeführten Experimenten zusammengestellt. Weiterhin ist zum Vergleich die Proteinkonzentration der zugesetzten Fraktionen angegeben. Darauf wird gesondert im folgenden Kapitel eingegangen.

Aus der Tabelle ist wiederum eindeutig zu erkennen, daß nur die 0 - 33 %- und 33 - 50 %-Präzipitate aller Mäuseseren bei sämtlichen untersuchten Zellen eine starke Supprimierung der IgE-Synthese bewirkten. Mit 50 - 70 %-Präzipitaten ließ sich die IgE-Produktion nicht inhibieren, nur in einem Fall (50 - 70 %-Präzipitat von Balb/c-Serum, A.CA-Zellen, 11. Tag Infektion: 39 % Suppression) zeigte sich ein abweichendes Resultat. Die Wirkung der Präzipitatisfaktionen wurde aus Zellen verschiedener Mäusestämme, die auch an verschiedenen Tagen der Infektion entnommen worden waren, ausgetestet. So ist es nicht verwunderlich, daß die IgE-Synthese durch gleiche Präzipitatisfaktionen nicht in jedem Experiment in gleichem Umfang supprimiert wurde.

SERUM	PRECIPITATE	PROTEIN CONCENTRATION (μ G / ML)	A. CA - CELLS			BALB / C - CELLS		
			N.B. - INFECTION			N.B. - INFECTION		
			N. I.	DAY 11 (1°)	DAY 5 (2°)	N. I.	DAY 21 (1°)	DAY 5 (2°)
BALB / c	0-33 %	170	53	100	N.D.	55	63	N.D.
		17	25	67	N.D.	49	34	N.D.
		1.7	9	33	N.D.	17	10	N.D.
	33-50 %	300	56	100	35	53	61	51
		30	38	71	14	35	25	27
		3	10	27	15	22	5	10
	50-70 %	275	+2	+6	9	+9	+6	13
		27.5	+2	8	2	6	7	11
		2.75	+5	39	+1	10	+9	6
B 10. G	0-33 %	235	68	100	49	72	66	58
		23.5	36	69	27	49	19	33
		2.35	10	27	7	16	15	16
	33-50 %	280	66	100	50	65	70	61
		28	37	78	25	50	39	35
		2.8	11	59	7	28	+6	18
	50-70 %	270	20	12	3	+3	11	11
		27	6	± 0	+3	+1	+10	3
		2.7	+6	+16	+4	+1	7	8
B 10. D2	0-33 %	200	N.D.	N.D.	34	N.D.	N.D.	55
		20	N.D.	N.D.	26	N.D.	N.D.	19
		2	N.D.	N.D.	+6	N.D.	N.D.	8
	33-50 %	325	N.D.	N.D.	50	N.D.	N.D.	61
		32.5	N.D.	N.D.	27	N.D.	N.D.	30
		3.25	N.D.	N.D.	12	N.D.	N.D.	11
	50-70 %	275	N.D.	N.D.	3	N.D.	N.D.	4
		27.5	N.D.	N.D.	5	N.D.	N.D.	+1
		2.75	N.D.	N.D.	7	N.D.	N.D.	2
N. I. = NOT INFECTED; N.D. = NOT DONE; + = ENHANCING EFFECT (%)								
• THE PROTEIN - CONCENTRATION IN THIS EXPERIMENT MUST BE MULTIPLIED WITH FACTOR 2, EXCEPT BALB / c: 0-33 % FRACTION								

Tab. 19: Suppression (%) der IgE-Synthese von A.CA- und Balb/c-Zellen durch Zugabe von Serum-Präzipitatfraktionen.
 +: Steigerung der IgE-Synthese (%);
 N.D. = nicht getestet;
 N.I. = nicht infiziert;
 1°: Erstinfektion, 2°: Reinfektion.

SERUM	PRECIPITATE	PROTEIN CONCENTRATION (μ g / ML)	A.CA - CELLS		BALB / c - CELLS	
			N.B. - INFECTION		N.B. - INFECTION	
			N.I.	DAY 11 (1°)	N.I.	DAY 21 (1°)
BALB / c	0-33 %	170	69	89	47	36
		17	30	51	37	3
		1.7	26	10	± 0	10
	33-50 %	300	87	92	79	75
		30	41	31	58	40
		3	12	± 0	21	± 0
H 10. G	0-33 %	275	52	N.D.	61	37
		27.5	29	N.D.	30	6
		2.75	13	N.D.	4	19
	33-50 %	235	59	N.D.	57	47
		23.5	42	N.D.	54	30
		2.35	2	N.D.	34	+10
	50-70 %	280	79	85	75	77
		28	64	51	41	43
		2.8	32	24	40	6
	50-70 %	270	39	29	39	13
		27	4	9	28	9
		2.7	18	8	11	± 0
B 10. D2	0-33 %	200	53	N.D.	72	69
		20	± 0	N.D.	38	28
		2	13	N.D.	32	9
	33-50 %	325	62	80	81	78
		32.5	61	53	45	37
		3.25	31	29	16	± 0
	50-70 %	275	26	± 0	33	19
		27.5	30	N.D.	15	+16
		2.75	+17	N.D.	+15	+27
	FCS	2000	19	N.D.	22	9
N.I. = NOT INFECTED; N.D. = NOT DONE; + = ENHANCING EFFECT (%)						

Tab. 20: Suppression (%) der Lymphozytenproli-
feration von A.CA- und Balb/c-Zellen
durch Serum-Präzipitatfraktionen
(vgl. Tab. 19).

Auffallend ist, daß bei Verdünnung der zugesetzten Proteinkonzentration um ein Zehntel, die suppressive Wirkung nicht im gleichen Umfang zurückgeht. Dies gilt auch für die Suppression der Lymphozytentransformation durch die Serumfraktionen (Tab. 20). Die Verringerung der zugesetzten Proteinkonzentration führt nicht zu einem Abfall der suppressiven Wirkung in gleichem Umfang. Beim Vergleich mit der Suppression der IgE-Synthese (Tab. 19) zeigt sich, daß die Lymphozytenproliferation (Tab. 20) auch bei Zusatz von 50 - 70 %-Präzipitaten supprimiert wird (Balb/c: 50 - 60 %, B10.G: 30 - 40 %, B10.D2: 30 % Suppression). Diese Präzipitatfraktion blieb dagegen bei der IgE-Synthese ohne Einfluß. Wie aus beiden Tabellen hervorgeht (Tab. 19, 20), spielt die Verwendung von unterschiedlichen Proteinkonzentrationen der verschiedenen Präzipitatfraktionen für die absolute Vergleichbarkeit der Suppressionswirkung eine große Rolle.

Durch die verschiedenen Fällungsschritte bei der Ammoniumsulfatpräzipitation, der anschließenden Dialyse und Sterilfiltration der neun Fraktionen, ergaben sich Unterschiede in der Proteinkonzentration der verwendeten Präparationen (170 - 325 µg/ml). Dies muß beim Vergleich der Ergebnisse berücksichtigt werden und war der Anlaß, die beschriebenen Resultate in einer weiteren Form darzustellen.

D.II.3.4.4.3. Die Suppressivität der Serumfraktionen im Verhältnis zur Proteinkonzentration

Der exakte Vergleich der Suppression von IgE-Synthese und Lymphozytenproliferation sowie der inhibitorischen Wirkung der verschiedenen Serumfraktionen ist nur möglich, wenn die eingesetzte Proteinmenge und ihre Wirkung auf die Parameter IgE-Synthese und Thymidineinbaurate in Beziehung gebracht werden. In den Untersuchungen war die suppressive Wirkung der Serumfraktionen von großer Bedeutung, daher wurde versucht, die 'Suppressivität' der verschiedenen Serumproteinfraktionen näher darzustellen und zu vergleichen.

Tab. 21 a

I. ADDITION OF 10 % (W/V) PRECIPITATE					
SERUM	PRECIPITATE	% SUPPRESSION / μ G PROTEIN			
		IgE- SYNTHESIS		3 H- THYMIDINE- UPTAKE	
		$\bar{x} \pm SE$	N	$\bar{x} \pm SE$	N
BALB/C	0 - 33 %	0.40 ± 0.10	4	0.36 ± 0.14	4
B 10.G		0.26 ± 0.04	6	0.14 ± 0.02	5
B 10.D2		0.33 ± 0.08	2	0.16 ± 0.03	3
BALB/C	33 - 50 %	0.17 ± 0.03	6	0.28 ± 0.03	4
B 10.G		0.22 ± 0.08	6	0.14 ± 0.01	4
B 10.D2		0.17 ± 0.03	2	0.12 ± 0.01	4
BALB/C	50 - 70 %	0.04 ± 0.01	2	0.09 ± 0.02	3
B 10.G		0.04 ± 0.02	5	0.05 ± 0.02	4
B 10.D2		0.01 ± 0	1	0.05 ± 0.02	3
FCS		0.0006 ± 0.0001	3	0.01 ± 0	2

Tab. 21 b

II. ADDITION OF 1 % (W/V) PRECIPITATE					
SERUM	PRECIPITATE	% SUPPRESSION / μ G PROTEIN			
		IgE- SYNTHESIS		3 H- THYMIDINE- UPTAKE	
		$\bar{x} \pm SE$	N	$\bar{x} \pm SE$	N
BALB/C	0 - 33 %	2.58 ± 1.08	4	1.78 ± 1.18	4
B 10.G		1.41 ± 0.43	6	0.89 ± 0.26	3
B 10.D2		1.15 ± 0.21	2	0.83 ± 0.18	2
BALB/C	33 - 50 %	0.98 ± 0.31	6	1.42 ± 0.38	4
B 10.G		1.34 ± 0.29	6	0.89 ± 0.19	4
B 10.D2		0.88 ± 0.06	2	0.76 ± 0.16	4
BALB/C	50 - 70 %	0.22 ± 0.12	5	0.40 ± 0.24	3
B 10.G		0.17 ± 0.08	2	0.23 ± 0.20	4
B 10.D2		0.18 ± 0	1	0.41 ± 0.20	2
FCS		0.005 ± 0.001	3	0.07 ± 0.05	3

Tab. 21: Suppressivität der Serum-Präzipitatfraktionen (Kap. D.II.3.4.4.) auf IgE-Synthese und Lymphozytenproliferation bei Zusatz von 10 %igen (Tab. 21 a) bzw. 1 %igen (Tab. 21 b) Konzentrationen. N = Anzahl der Versuche; % Suppression/ μ g Protein = 'Suppressivität' (vgl. S. 181).

Als 'Suppressivität' wird definiert: Quotient aus der suppressiven Wirkung der Fraktion (% Suppression) und eingesetzter Proteinkonzentration (μg Protein). Dieser Suppressivitätsfaktor wurde für die Ergebnisse der IgE-Synthese bzw. Lymphozytentransformation ermittelt. Es wurden für jede Präzipitatfraktion die Mittelwerte der Suppressivität aus jedem durchgeführten Experiment gebildet (Tab. 21 a, 21 b). Das heißt: die Ergebnisse, die mit den Serumfraktionen bei verschiedenen Zellen (A.CA, Balb/c) an unterschiedlichen Tagen einer N.b.-Infektion erhalten worden waren, wurden zusammengefaßt. Für die Untersuchung der IgE-Synthese konnten daher maximal sechs Experimente (vgl. Tab. 19), für die der Lymphozytentransformation vier Experimente (vgl. Tab. 20) herangezogen werden. Die Mittelwerte der Suppressivität von zwei Präzipitatverdünnungen (10 % w/v; 1 % w/v) sind dargestellt (Tab. 21 a, 21 b). Es war festgestellt worden (vgl. D.II.3.4.4.2.), daß Serumfraktionen in geringerer Verdünnung keine Wirkungen auf die IgE-Synthese bzw. Lymphozytentransformation hatten.

Sowohl für die IgE-Synthese als auch die Thymidineinbaurate ist die Suppressivität der Serumfraktionen konzentrationsabhängig. Eine geringere Proteinkonzentration (1 % w/v) führt zu einer im Verhältnis stärkeren Suppressivität der IgE-Synthese (0,17 - 2,58 %Suppression/ μg Protein) und Lymphozytenproliferation (0,23 - 1,78 %Suppression/ μg Protein) als die Verwendung von höheren Proteinkonzentrationen (10 % w/v). Diese zieht niedrigere Suppressivitätswerte nach sich (IgE-Synthese: 0,01 - 0,40 %Suppression/ μg Protein; Thymidineinbaurate: 0,05 - 0,36 %Suppression/ μg Protein).

In den Abbildungen 45 und 46 sind diese Ergebnisse graphisch dargestellt. Dort werden auch die Unterschiede der Präzipitate verschiedener Mäuseseren deutlich. Die größte Suppressivität zeigt das 0 - 33% -Präzipitat von Balb/c-Serum; das gilt für beide Proteinkonzentrationen (10 %, Abb. 45; 1 %, Abb. 46) und gleichermaßen für die Suppression der IgE-Synthese und der Lymphozytentransformation. Bei Verwendung der 33 - 50 %-Präzipitate zeigt sich nur bezüglich der Thymidineinbaurate eine deutlich größere Suppressivität von Balb/c-Serum; in der IgE-

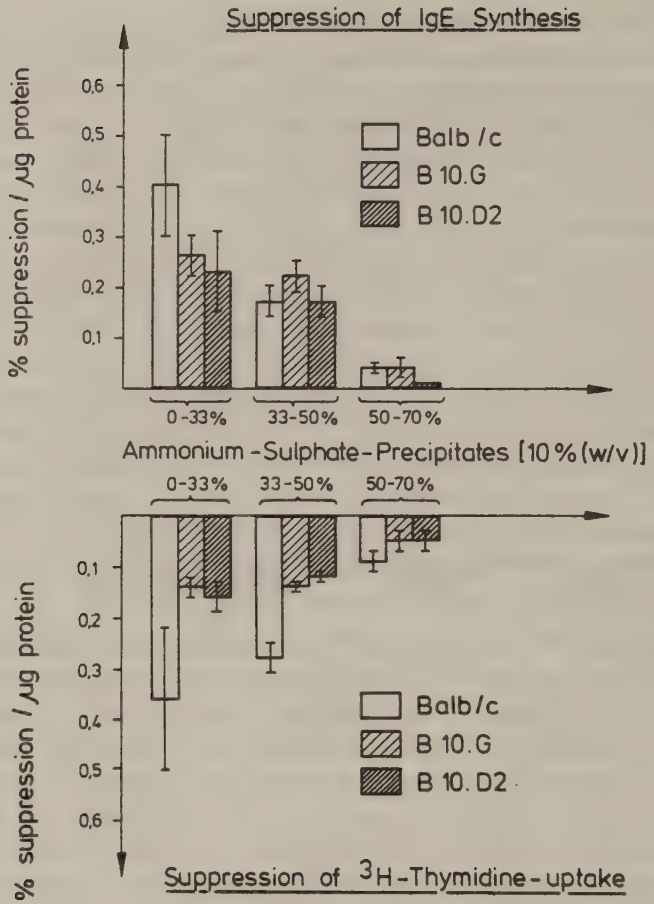


Abb. 45: Suppression von IgE-Synthese und ³H-Thymidin-Einbau durch Zugabe (10 % w/v) verschiedener Ammoniumsulfatpräzipitate von Mäuseseren.
Ordinate: Suppressivität (% Suppression/µg Protein)

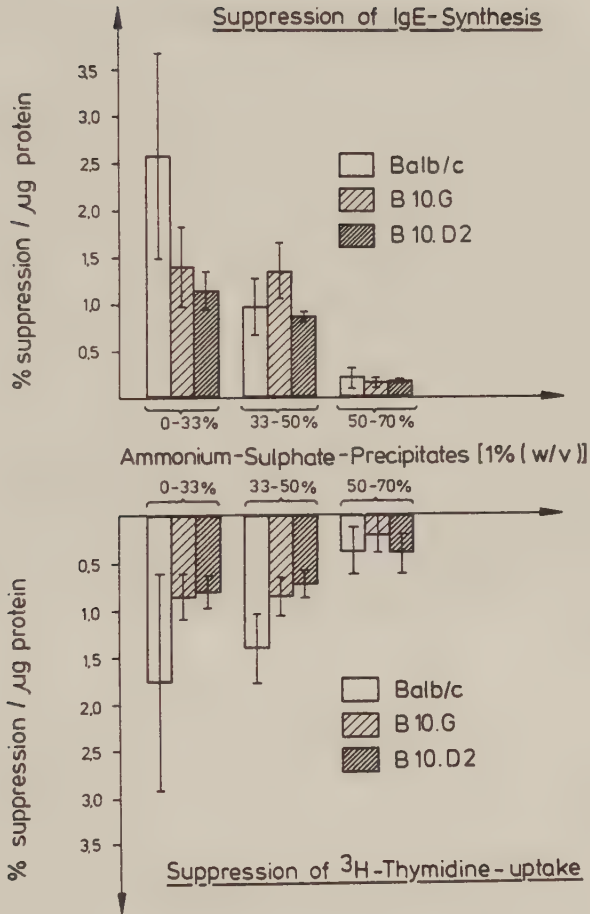


Abb. 46: Suppression von IgE-Synthese und ^3H -Thymidin-Einbau durch Zusatz von 1 % (w/v) verschiedener Präzipitatfraktionen (vgl. Abb. 45).

Synthese war dagegen eine leicht erhöhte Wirkung der B10.G-Serumfraktionen festzustellen.

Eine geringe Suppressivität der 50 - 70 %-Präzipitate besteht, wie schon erwähnt, nur auf die Lymphozytenproliferation, die IgE-Synthese wird nicht beeinflusst. Weiterhin ist festzustellen, daß die 0 - 33 %-Präzipitate eine größere Suppressivität für die IgE-Synthese besitzen und die Thymidineinbaurate weniger stark supprimieren. Das gilt innerhalb der 33 - 50 %-Präzipitate nur für B10.G- und B10.D2-Serum. Die 33 - 50 %-Präzipitatfraktion von Balb/c-Serum zeigt eine größere Suppressivität für die Lymphozytentransformation; das gilt für beide untersuchten Proteinkonzentrationen (10 % w/v; 1 % w/v).

Diese Ergebnisse der Wirkung von verschiedenen Serumfraktionen auf die IgE-Synthese in vitro und die Lymphozytentransformation deuten darauf hin, daß weitere biochemische Untersuchungen und Auftrennungen der 0 - 33 %- und 33 - 50 %-Fraktionen von Mäuseseren durchgeführt werden müssen, um klären zu können, welche Faktoren für die Suppression der IgE-Synthese verantwortlich sind.

D.II.3.4.5. Zusammenfassung der Ergebnisse mit Mäuseseren und -serumfraktionen

Konzentrationsabhängig zeigte sich bei Zusatz von normalen Mäuseseren in vitro eine Suppression der IgE-Produktion von Zellen nicht infizierter Mäuse und von Zellen aus der N.b.-Infektion. Auch wurde die Lymphozytentransformation teilweise inhibiert. Dagegen verfügte foetales Kälberserum über keinen Einfluß auf die IgE-Synthese. Fraktionierung verschiedener Mäuseseren durch Ammoniumsulfatpräzipitation zeigte, daß nur die 0 - 33 %- und 33 - 50 %-Fraktionen in der Lage waren, die IgE-Synthese zu supprimieren. Es wurde festgestellt, daß auch die Lymphozytenproliferation durch beide Fraktionen inhibiert werden konnte. Die Suppressivität der 0 - 33 %-Präzipitate ist für die IgE-Synthese größer als für die Lymphozytentransformation. Dagegen wirken die 50 - 70 %-Präzipitate auch auf die Lymphozytenproliferation suppressiv, zeigen aber keinen Einfluß auf die IgE-Produktion.

D.II.4. Zusammenfassung der in vitro-Experimente

Die spontane in vitro IgE-Synthese von nicht N.b.-infizierten Mäusen liegt bei 10 - 15 ng/ml, die Erstinfektion mit N.b. bleibt ohne großen Einfluß auf die IgE-Produktion, während nach Reinfektion mit N.b. die Spontansynthese erheblich gesteigert werden kann. Die IgE-Syntheseleistung nicht N.b.-infizierter Mäuse kann durch verschiedene Mitogene (PWM, LPS, ConA) gesteigert werden. Die durch Mitogene induzierte Zunahme der IgE-Produktion übersteigt aber nicht die Spontansynthese N.b.-infizierter bzw. -reinfizierter Mäuse in vitro. Zusatz von Kulturüberstand adulter N.b.-Würmer oder eines N.b.-Homogenates bewirkt nur geringe Einflüsse auf die IgE-Synthese. Zusatz normaler Mäuseseren verursacht eine konzentrationsabhängige Suppression der IgE-Synthese. Nach Fraktionierung durch Ammoniumsulfatpräzipitation haben die 0 - 33 %- und 33 - 50 %-Präzipitate inhibitorische Wirkung auf die IgE-Synthese. Die 50 - 70 %-Fraktion übt auch suppressive Einflüsse auf die Lymphozytentransformation aus.

E. Diskussion

E.I. Die IgE-Antikörperantwort gegen N.b. in vivo

E.I.1. Die spezifische IgE-Produktion

Die Untersuchung von 36 verschiedenen Mäusestämmen bezüglich der IgE-Antikörperproduktion gegen N.b. zeigte eine klare Trennung in Stämme, die IgE-Antikörper spezifisch für N.b. produzierten und in solche, die dazu nicht in der Lage waren (Tab. 1 a, 1 b).

Die Bildung spezifischer IgE-Antikörper gegen N.b. wurde mit Hilfe der PCA-Reaktion in Ratten nachgewiesen; die Sensibilisierungszeit betrug zwei Stunden. Diese Methode der Messung von IgE-Antikörpern in der Ratte wurde von Mota und Wong (1969) eingeführt; sie hatten festgestellt, daß die Antikörpertiter sowohl bei Anwendung einer zweistündigen als auch einer 72-stündigen Sensibilisierungsphase gleich waren. Andere Autoren fanden, daß höhere Antikörpertiter mit längeren Sensibilisierungsphasen - Maximum bei 48 Stunden - erreicht wurden (Ovary, Caiazza und Kojima, 1975).

Es wurden auch Untersuchungen vorgelegt, in denen ein Anstieg der PCA-Titer bei Auslösung der Reaktion in den ersten zwei Stunden nach Injektion der Antikörper festgestellt wurde. Bei einer Sensibilisierungszeit von zwei bis vier Stunden stellte sich ein Plateau ein, das unverändert bis zum Auslösen der Reaktion mit dem homologen Antigen nach 72-stündiger Sensibilisierung blieb (Okudaira, Suzuki und Ogita, 1980).

Es ist also zu fragen, ob die verwendete Methode der zweistündigen Sensibilisierungsphase bei den 23 Mäusestämmen ausreichte, antigenspezifische IgE-Antikörper im Serum nachzuweisen. Dies ist eindeutig zu bejahen: einerseits bindet sich IgE mit außerordentlich hoher Affinität an seinen Rezeptor (König und Ishizaka, 1974; König, Okudaira und Ishizaka, 1974; König, 1977) und zum anderen reichen zwei juxtaponierte, zellständige IgE-Moleküle aus, um nach Bindung des homologen Antigens die Entzündungssubstanzen aus den Zielzellen freizusetzen (König und

Pfeiffer, 1981). Das führt im Fall der PCA-Reaktion zur Gefäß-erweiterung und Bläuung des Gewebes an der Stelle, wo IgE-haltiges Mäuseserum eingespritzt wurde.

Zu diskutieren ist weiterhin eine unspezifische Desensibilisierung, die bei den NR-Mäusen durch das Antigen stattgefunden haben könnte. Es hat sich nämlich gezeigt, daß die Konzentration des Antigens von Bedeutung ist. Liegt die Antigenkonzentration unter der für die Zellaktivierung notwendigen Dosis oder aber sehr weit darüber, findet keine Aktivierung der Zelle sondern Desensibilisierung statt (König, Pfeiffer, Szperalski und Bohn, 1981). Da die verwendete Antigendosis jedoch immer konstant gehalten wurde (vgl. Kap. C.II.5.), ist ein Desensibilisierungseffekt bei NR-Mäusen nicht wahrscheinlich.

Letztendlich könnte auch das in unserem Labor beschriebene Protein (König und Henn, 1979; Theobald und König, 1981), das in der Lage ist, die PCA-Reaktion in der Ratte durch Inhibierung der Histaminfreisetzung zu blockieren, für das negative Ergebnis von PCA-Reaktionen der NR-Mäuse verantwortlich sein. Dagegen spricht, daß dieser 'blocking-factor' im Serum von Mensch, Meerschweinchen und Ratte, nicht aber in dem von Mäusen (Balb/cJ, CBA/1, DBA/2) nachgewiesen wurde, die mit Ovalbumin immunisiert worden waren. Der Einwand, daß die IgE-Antwort von Balb/c-Mäusen gegen Ovalbumin nicht mit der gegen N.b.-Antigen identisch ist und daher ein blockierender Faktor in der N.b.-Antwort vorhanden sein könnte, wird aber durch den Nachweis einer spezifischen IgE-Produktion der CBA-Mäuse (Tab. 1 b) - parallel zum Fehlen dieses Faktors bei der IgE-OA-Antwort - entkräftet.

Es kann also festgestellt werden, daß kein Nachweis von spezifischem IgE gegen N.b. bei verschiedenen Mäusestämmen bzw. das Fehlen dieser IgE-Antwort nicht auf Unzulänglichkeiten der Nachweismethode (PCA-Reaktion) beruhen, sondern andere Ursachen dafür verantwortlich sein müssen.

Es wurde schon in Kapitel D.I.1.1.2. (S.86) dargelegt, daß die Infektion mit N.b. in allen untersuchten Mäusestämmen erfolgreich war, d. h. es konnten adulte Würmer im Intestinum der Tiere nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen wurden jedoch

nicht quantitativ durchgeführt. Allerdings fiel auf, daß in einigen Mäusestämmen (A.CA, B10.M) eine größere Wurmdichte bestand als bei den anderen Mäusen.

Wie Watanabe, Kojima und Ovary (1976) zeigten, verläuft die Infektion mit N.b. in SJL-Mäusen und anderen Mäusestämmen gleich: weder die Eiproduktion noch die Zahl der adulten Würmer war verschieden. Sie konnten somit ausschließen, daß die beobachteten Unterschiede in der anti-DNP IgE-Produktion und deren Suppression in SJL-Mäusen auf Abweichungen im Infektionsverlauf bei unterschiedlichen Mäusestämmen beruhten.

Auch Mitchell et al. (1982) berichten, daß verschiedene, häufig verwendete Mäusestämmen nach der Infektion mit N.b.-Larven, die von Ratten gewonnen worden waren, keine Unterschiede in der Zahl von adulten Würmern, dem Zeitpunkt des Ausscheidens der Würmer aus dem Darm oder der Ausprägung einer Resistenz gegen N.b. nach einer Sekundärinfektion aufwiesen (Mitchell, Anders, Brown, Handman, Roberts-Thomson, Chapman, Forsyth, Kahl und Cruise, 1982).

Diese Untersuchungen stehen im Einklang mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen, daß die Unterschiede in der Ausprägung einer spezifischen IgE-Antikörperproduktion nicht auf Abweichungen im Infektionsverlauf bei verschiedenen Mäusestämmen zurückzuführen sind.

Die IgE-Antikörperbildung im Verlauf der Erstinfektion mit N.b. wurde ausschließlich durch Blutentnahme am 14. Tag nach Infektion bestimmt und es wurden nur bei A.CA- und B10.M-Mäusen IgE-Antikörper im Serum gefunden (Tab. 16). Es ist nicht auszuschließen, daß auch noch andere Mäusestämmen in der Erstinfektion mit der Produktion von IgE-Antikörpern gegen N.b. reagieren. Untersuchungen im Rattenmodell haben nämlich gezeigt (Wilson und Bloch, 1968; Ishizaka, Urban, Takatsu und Ishizaka, 1976; Jarrett, 1978; Allan und Mayrhofer, 1981), daß spezifische anti-N.b. IgE-Antikörper erst drei Wochen nach der Injektion von N.b.-Larven im Serum nachzuweisen waren, wobei auch individuelle Unterschiede zwischen den Tieren auftraten (Ishizaka, Urban, Takatsu und Ishizaka, 1976). In den

o. g. Untersuchungen wurden Sprague-Dawley-, WAG- und Lewis-Ratten verwendet. Stockinger (1979) konnte nach Erstinfektion von Wistar-Ratten keine N.b.-spezifischen IgE-Antikörper nachweisen; diese traten erst nach einer folgenden zweiten N.b.-Infektion (vier Wochen später) im Serum auf.

Basierend auf der Ausprägung ihrer maximalen sekundären IgE-Antikörperproduktion gegen N.b. (Tab. 16) wurden die 13 Responderstämme in drei Gruppen unterteilt (Kap. D.I.1.1.1., S.75). Es zeigte sich, daß die Kinetik der IgE-Antwort von Mäusestämmen, die einer gleichen Respondergruppe zugeordnet worden waren, parallel verlief (Abb. 9, Abb. 10) bzw. die LR-Gruppe durch Unterschiede im zeitlichen Verlauf einer geringen Antikörperproduktion gekennzeichnet war (Abb. 11). Diese und die oben diskutierten Ergebnisse (Einfluß der Meßmethode, gleicher Infektionsverlauf bei allen Mäusestämmen) führen zu der Fragestellung einer genetischen Abhängigkeit der IgE-Bildung im System der Infektion und Reinfektion von Mäusen mit N.b. Bevor dieser Aspekt jedoch weiter erörtert wird, sollen erst die Daten über die totale IgE-Synthese sowie die Ergebnisse der IgG1-Produktion diskutiert werden, um dann den genetischen Aspekt in toto zu behandeln.

E.I.2. Die totale IgE-Produktion

In Kapitel D.I.2. (S. 98) wurde untersucht, in welchem Umfang die Gesamt-IgE-Produktion durch die Infektion mit N.b. beeinflusst wird. Dabei wurden zwei wesentliche Ergebnisse, abweichend von der Bildung des antigenspezifischen IgE, erhalten.

Die Infektion mit N.b. induziert einen bis zu 30fachen Anstieg des Serumspiegels von IgE. Dieser Anstieg wird durch eine Sekundärinfektion noch weiter gesteigert: es kann ein Quotient aus maximalem IgE-Spiegel und dem Basalwert nicht infizierter Tiere von 70 bis 80 erreicht werden (Tab. 9). Diese außergewöhnlich hohe Bildung von IgE konnte bei allen Mäusestämmen demonstriert werden.

Die Befunde, daß der Serumspiegel des IgE am 14. Tag nach Erstinfektion sein Maximum erreicht, stehen ebenso im Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren (Ishizaka, Urban, Takatsu und Ishizaka, 1976; Jarrett, Haig und Bazin, 1976; Stockinger, 1979) wie der weitere Anstieg der totalen IgE-Produktion nach Reinfection. Auch die Größe des Steigerungsfaktors im Vergleich zu nicht N.b.-infizierten Tieren wird von anderen Autoren bestätigt (Jarrett und Bazin, 1974; Carson, Metzger und Bloch, 1975; Ishizaka, König, Kurata, Mauser und Ishizaka, 1975). Diese angeführten Ergebnisse wurden im Rattenmodell erarbeitet.

Aus Untersuchungen der N.b.-Infektion von Mäusen liegt dagegen ein Befund vor (Chen, Bohn, Liu und Katz, 1981), der nur einen 7- bis 10-fachen Anstieg der IgE-Produktion nach N.b.-Infektion nachweist. Allerdings wurden die Mäuse mit einer geringeren Anzahl (300 - 500) Larven infiziert, während in dieser Arbeit jeweils 750 Larven verwendet wurden. So entsteht auch eine Diskrepanz zwischen den Absolutwerten der IgE-Produktion. In der Arbeit von Chen et al. mit (Balb/c x A/J) F1-Mäusen wird ein Anstieg des totalen IgE von 0,4 µg/ml am vierten Tag nach N.b.-Infektion auf 3,4 µg/ml am 16. Tag nach Erstinfektion nachgewiesen. Dagegen wurde hier gezeigt, daß der IgE-Spiegel von durchschnittlich 0,35 µg/ml (Tab. 8) auf 9 - 10 µg/ml am 14. Tag nach Infektion steigt (Tab. 9).

Unterschiede in der Messung von absoluten Werten können auch durch die Verwendung unterschiedlicher Antiseren, produziert mit verschiedenen monoklonalen IgE-Präparationen bzw. Verschiedenheiten bei der Meßmethodik bedingt sein. Es besteht eine Übereinstimmung zwischen den Serumwerten des totalen IgE von Hooded Lister-Ratten (0,35 µg/ml; Jarrett und Bazin, 1974), Fischer- und OKA/Wsl-Ratten (0,5 µg/ml; Rousseaux-Prévost, Bazin und Capron, 1977) und den hier untersuchten Mäusen (Tab. 8). Dagegen ergaben sich Differenzen beim Vergleich der Werte von Sprague-Dawley-Ratten (1,15 µg/ml; Carson, Metzger, und Bloch, 1975) sowie LOU/M/Wsl- und auch Hooded Lister-Ratten (2,7 µg/ml; Rousseaux-Prévost, Bazin und Capron, 1977). Bei der Untersuchung von Carson et al. zeigte sich bei acht getesteten

Individuen eine große Schwankungsbreite der Werte von 0,3 µg/ml bis 4,6 µg/ml bei nicht infizierten Tieren.

Im hier untersuchten Mäusemodell wurde dagegen der IgE-Gehalt von Poolseren nicht infizierter Tiere gemessen; Untersuchungen von Einzeltieren wurden nur am siebten Tag nach der Reinfektion vorgenommen (Abb. 18, Abb. 19). Dort traten auch individuelle Unterschiede auf; der Vergleich der rechnerisch ermittelten Mittelwerte dieser Einzeltiere mit den gemessenen Werten der Poolseren der gleichen Tiere zeigte eine gute Übereinstimmung beider Werte (Tab. 10). Dies läßt den Rückschluß zu, daß die Schwankungsbreiten der Individualtiter nicht N.b.-infizierter Mäuse geringer sind als die von Carson et al. für Ratten demonstrierten Werte.

Im Mäusemodell konnten keine stammspezifischen Unterschiede der Basaltiter des Serum-IgE festgestellt werden (Tab. 8); auch nach der Infektion bzw. am Maximalpunkt der Sekundärinfektion (Tag 10, Tab. 9) fanden sich nicht so große Unterschiede in der IgE-Produktion, wie sie im Serum von Ratten nach N.b.-Infektion bzw. Infektion mit *Schistosoma mansoni* demonstriert wurden. Im N.b.-Modell stieg der IgE-Spiegel am zwölften Tag nach Infektion bei Hooded Lister-Ratten auf 247 µg/ml an, bei Wistar-Ratten wurden nur 25 µg/ml gemessen (Jarrett und Bazin, 1974). Vergleicht man den Wert von nicht infizierten Ratten beider Stämme (0,35 µg/ml), ergab sich somit eine unterschiedliche Steigerungsrate der IgE-Produktion von 100 %. Die maximale IgE-Produktion in *Schistosoma*-infizierten Ratten schwankte zwischen dem 14fachen Basalwert bei OKA/Wsl-Ratten und dem 60fachen Basallevel bei LOU/M/Wsl-Ratten (Rousseaux-Prévost, Bazin und Capron, 1977). Die Steigerungsrate der IgE-Bildung der untersuchten Mäusestämme (Tab. 9) variierte zwischen dem 31fachen und 73fachen Basalwert. Beim Vergleich der totalen IgE-Produktion mit der Bildung von spezifischen IgE-Antikörpern gegen N.b. ist deutlich zu erkennen (Tab. 9, S. 102; Tab. 1 b, S. 77), daß die Einteilung in Respondergruppen bezüglich der spezifischen IgE-Antwort für die totale IgE-Produktion keine Gültigkeit hat. Dieses wird auch aus dem Verlauf der Kinetiken der totalen IgE-Antikörper

(Abb. 15, Abb. 16) deutlich: dort sind keine übereinstimmenden Kurvenverläufe verschiedener Mäusestämme zu beobachten, wie das bei der Produktion von spezifischen IgE-Antikörpern der Fall war (Abb. 9, Abb. 10).

E.I.3. Die Produktion von IgG1 sowie die Bildung spezifischer Antikörper gegen N.b.

Die Zunahme der Antikörperbildung gegen andere Antigene aufgrund einer parasitären Infektion ist auf die IgE-Produktion beschränkt, wie schon in der Einleitung (Kap. B.3.2.) erwähnt wurde. Bei der Untersuchung der totalen Immunglobulinproduktion in Ratten, die nach Immunisierung mit OA einer Infektion und Reinfektion mit N.b. unterzogen worden waren, konnte gezeigt werden (Jarrett und Bazin, 1977), daß die Serumwerte des IgG1 dagegen im Verlauf der Infektion mehr oder weniger anstiegen, aber bei weitem nicht so stark, wie es für das IgE der Fall war. Die Untersuchungen verschiedener Inzuchtmäuse (Kap. D.I.3.2.; Tab. 12) verdeutlichen, daß dies auch für das Infektionssystem mit N.b. in der Maus Geltung hat. Der Anstieg des IgG1 in der Reinfektion im Vergleich zu nicht infizierten Tieren erwies sich als nicht so groß wie für die IgE-Bildung. Auch konnte nur in zwei Mäusestämmen die Produktion von antigenspezifischem IgG1 nachgewiesen werden (Tab. 12, S. 114). Diese Ergebnisse zeigen den Unterschied der parasitären Infektion zu anderen Immunisierungsmodellen, in denen bei der Gabe von geringen Dosen Ovalbumins eine hohe spezifische IgG1-Produktion nach Sekundärimmunisierung in verschiedenen Mäusestämmen demonstriert wurde (Vaz, de Souza und Sauerbronn Maia, 1974).

Neben der Produktion von IgG1-Antikörpern wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz auch die Bildung spezifischer Antikörper gegen N.b. untersucht (Kap. D.I.3.3., Tab. 13), wobei die Antikörperbindung an Larven des dritten Larvenstadiums sowie an adulte Würmer getestet wurde. In den Seren reinfizierter Mäuse konnten sowohl Antikörper gegen die Larvenform als auch das adulte Stadium des Parasiten nachgewiesen werden. Es waren weiterhin auch im Serum von drei nicht N.b.-infizierten Mäusestämmen (A.TFR5, A.TFR1, SJL) N.b.-spezifische Antikörper gegen die Larvenform reproduzierbar nachzuweisen (Tab. 13, S. 116).

Aus fluoreszenzserologischen Untersuchungen weiß man, daß Antikörper gegen N.b. nur in Antiseren von parasitierten Mäusen enthalten sind; sie gehören der IgG-, IgM- und IgA-Immunglobulinklasse an und binden sich an verschiedene Gewebesektionen des Parasiten (Seese, Wescott und Gorham, 1976). Diese Autoren untersuchten allerdings nur die Antikörperbildung gegen adulte Würmer. Das Vorhandensein von Antikörpern gegen Oberflächenstrukturen von N.b.-Larven (in den hier durchgeführten Versuchen wurde die Bindung der Antikörper an vollständige Larven bzw. Würmer untersucht) im Serum von Mäusen, die noch nie mit dem Parasiten in Kontakt gekommen waren, wirft eine Reihe von Fragen auf, die aufgrund des durchgeführten Experimentes noch nicht zu beantworten sind und neben immunologischer auch von parasitologischer Bedeutung sind.

Aus Studien über die Oberflächenproteine von Parasiten ist bekannt, daß nur eine begrenzte Anzahl von Proteinen (zwischen 1 bis 10) die Oberfläche von jedem Stadium einer jeden Nematodenspecies ausmachen (Maizels, Philipp und Ogilvie, 1982). So besteht die Oberfläche von adulten N.b.-Würmern aus acht Proteinen, dieser Parasit zeigt wie *Trichinella spiralis* eine genaue Stadiumspezifität hinsichtlich der Proteinzusammensetzung. Es wurde aber auch nachgewiesen, daß N.b.-Larven des gleichen Entwicklungsstadiums, die aus einer unterschiedlichen Umgebung gewonnen wurden, eine vollständig verschiedene Oberflächenstruktur besaßen. Bis jetzt konnte die Frage, welche antigenen Determinanten verschiedener Parasitenstadien vom Wirtsorganismus erkannt werden und mit der Produktion von Antikörpern in Verbindung stehen, noch nicht geklärt werden. Wie die in Kap. D.I.3.3. dargestellten Ergebnisse zeigen, bleiben auch im System der N.b.-Infektion und der Präsenz von Antikörpern gegen den Parasiten noch viele Fragen zu diesem Komplex offen.

E.I.4. Die genetische Regulation der IgE-Bildung

In der Einleitung wurde dargestellt (Kap. B.4.2.), daß zwischen vielen Mäusestämmen auffallende Unterschiede in der Ausprägung der Antikörperproduktion gegen verschiedene Antigene bestehen.

Es gibt sogenannte Highresponderstämme oder auch Low- bzw. Nonresponderstämme bezüglich der Antikörperbildung gegen ein bestimmtes Antigen (Benacerraf und McDevitt, 1972). Die Unterschiede, eine Immunantwort auszubilden oder auch nicht, sind in vielen Fällen genetisch bedingt und werden durch Immun-Response-Gene (Ir-Gene) kontrolliert (McDevitt, Deak, Schreffler, Klein, Stimpfling und Snell, 1972), die in der I-Region des H-2-Komplexes oder auch in der K-Region (Zaleski und Klein, 1977; Maron und Cohen, 1979) lokalisiert werden konnten.

Ein wesentlicher Teilaspekt dieser Arbeit bestand darin, die bisher noch nicht untersuchte IgE-Antikörperantwort gegen N.b. von verschiedenen Inzuchtmäusestämmen hinsichtlich ihrer genetischen Regulation zu analysieren. Dabei wurden zwei grundlegende Ergebnisse erarbeitet:

- (1) die Produktion von spezifischen IgE-Antikörpern gegen diesen Parasiten unterliegt einer genetischen Kontrolle (Kap. D.I.1.1.3., S. 86),
- (2) die potenzierte totale IgE-Bildung (Kap. D.I.2., S. 98) läßt keine genetische Regulation erkennen.

Aus dem Vergleich des H-2-Haplotyps mit der Produktion von spezifischen IgE-Antikörpern gegen N.b. geht klar hervor (Tab. 1b, Tab. 3), daß die Ausprägung einer hohen spezifischen IgE-Antwort mit dem f-Haplotyp der Mäuse korreliert ist. Es kann daher ein Ir-Gen für *Nippostrongylus brasiliensis* postuliert werden. In der Erstinfektion bilden nur die Mäuse mit dem f-Haplotyp (A.CA; B10.M) spezifische IgE-Antikörper, diese beiden Stämme zeigen zusammen mit den A.TFR5-Mäusen nach der Reinfektion die höchsten Antworten. Diese drei Stämme wurden als Gruppe der Highresponder bezeichnet (Kap. D.I.1.1.1.), sie unterscheiden sich nicht nur durch ihre maximale Antikörperproduktion von allen anderen Stämmen sondern sie prägen auch die längste Persistenz der spezifischen IgE-Antwort (Abb. 9) aus. Die Lokalisation eines Ir-Gens für N.b. kann ebenfalls postuliert werden. Aus der Analyse der H-2-Haplotypen geht hervor (Tab. 3), daß das Gen in der Region zwischen dem K- und J-Lokus liegen muß.

Das entspricht dem Gebiet, das nach der älteren Nomenklatur der I-Region zugeordnet ist und in dem schon einige Ir-Gene nachgewiesen wurden (Benacerraf und Germain, 1978). Der einzige untersuchte Mäusestamm (A.TFR1), der außer den drei Highrespondern noch den f-Haplotyp trägt (im D-Lokus) zeigt dagegen keine spezifische IgE-Bildung.

Es ist nicht einfach, dieses Ergebnis mit früheren Befunden aus der Literatur zu vergleichen, da die bisher gefundenen Ir-Gene meist die Immunantwort gegen synthetische Polypeptide (McDevitt und Benacerraf, 1969) oder Eiweiße - Ovalbumin, Kälbergammaglobulin - (Vaz und Levine, 1970; Vaz, Vaz und Levine, 1970) kontrollieren, also genau definierte Antigene.

Bei der Charakterisierung eines Ir-Gens für Ragweed-Extrakt bzw. DNP-Ragweed (Dorf, Newburger, Hamaoka, Katz und Benacerraf, 1974) zeigte sich, daß die beiden Stämme A.CA bzw. B10.M (HR für N.b.) zu den Lowrespondern bei der Antwort auf Ragweed-Antigen gehören. Die Autoren testeten 26 verschiedene Mäusestämme, von denen 16 eine hohe IgE-Antwort gegen dieses Allergen ausbildeten. Fünf dieser HR-Stämme, die auch im N.b.-Modell untersucht wurden, bildeten gegen das parasitäre Antigen keine IgE-Antikörper. Nur B10.A (2R) und B10.A (4R) zeigten sowohl für Ragweed- als auch N.b.-Antigen eine mittelhohe IgE-Produktion.

Der Nachweis einer genetischen Abhängigkeit der IgE-Antwort in einem parasitären Modell wurde bei der Infektion von Mäusen mit *Trichinella spiralis* geführt (Rivera-Ortiz und Nussenzweig, 1976). Diese Autoren konnten drei HR- und zwei NR-Stämme klassifizieren und fanden in F1-Hybridmäusen mittlere Immunantworten.

Dies führt zum Vergleich der Ergebnisse mit den im N.b.-Modell durchgeführten Kreuzungen zwischen HR- und NR-Tieren (Tab. 4, Tab. 5). Bei der Interpretation des Ergebnisses muß der Unterschied zwischen Einzeltieren und Poolseren beachtet werden. Das Ir-Gen für N.b. wurde durch Austestung von Poolseren (fünf Mäuse pro Gruppe) charakterisiert, wie es auch für das Ragweed-Antigen durchgeführt wurde. Die Poolseren der verschiedenen

F1-Hybridmäuse (A.CA x Balb/c, B10.M x Balb/c) weisen sämtlich im Verlauf der Reinfektion keine hohen IgE-Titer auf sondern zeigen eine schwache bis mittelhohe Antwort. Dies steht im Einklang mit den erwähnten Ergebnissen von Rivera-Ortiz und Nussenzweig (1976), daß F1-Hybridmäuse aus Kreuzungen zwischen High- und Nonrespondern mittlere Immunantworten produzieren. Um den genauen Erbgang vollständig erfassen zu können, müssen an diesem Punkt weitere Kreuzungsexperimente, d. h. Rückkreuzungen der F1-Tiere mit den Elternstämmen durchgeführt werden, um danach die IgE-Antwort dieser Population zu untersuchen.

Die Analyse von Einzeltieren zeigte, daß individuelle Unterschiede bei der Ausprägung einer spezifischen IgE-Antwort gegen N.b. in der F1-Generation weitaus häufiger waren (Tab. 4, 5) als bei den Elterntieren (Abb. 12, 13). Serologische Untersuchungen bzw. H-2-Typisierungen solcher F1-Generationen sollten weitere Beiträge über die Zusammenhänge zwischen der genetischen Determinierung eines Individuums und seiner IgE-Produktion liefern können.

Neben der Untersuchung einer Infektion von Mäusen mit lebenden *Trichinella*-Parasiten (s. o.) wurde auch die genetische Abhängigkeit der IgE-Immunantwort gegen ein lösliches Antigen von *Trichomonas vaginalis* gezeigt (Yano, Kaji, Kojima und Ovary, 1982). Diese Autoren wiesen nach, daß ein lösliches Antigen - gewonnen durch Sonikierung der in vitro kultivierten Parasiten - in der Lage ist, eine spezifische IgE-Antikörperproduktion in Mäusen auszulösen. Weiterhin postulieren sie aufgrund der Antikörperantworten verschiedener Mäusestämme ein Ir-Gen für *Trichomonas vaginales* (Tr.v.). Es wurde gezeigt, daß H-2^a- bzw. H-2^b-Mäuse (B10.A und C57BL/6) IgE-Antikörper gegen den Parasiten bilden, B10.S (H-2^S) bzw. die Rekombinante zwischen B10.A und B10.S - B10.S (9R) - dazu nicht in der Lage ist. Daneben wurde in der o. a. Arbeit gezeigt, daß die IgE-Antikörperantwort gegen Tr.v. nicht nur durch ein an den H-2-Komplex gekoppeltes Ir-Gen kontrolliert wird. Im Tr.v.-Modell zeigte sich eine Kontrolle durch ein Gen bzw. mehrere Gene, die außerhalb des H-2-Komplexes lokalisiert sein müssen. Mäuse

gleichen Haplotyps (H-2^d: Balb/c bzw. B10.D2; H-2^a: A/J bzw. B10.A) gehören zu unterschiedlichen Respondertypen (HR: Balb/c, A/J; NR: B10.D2; LR: B10.A).

Dies bestätigt die im N.b.-Modell erhaltenen Befunde (Tab. 3), daß Mäuse mit dem H-2^k-Haplotyp unterschiedliche IgE-Antworten gegen N.b. aufweisen. CBA/Lac sind Mediumresponder, B10.BR wurde aufgrund der geringen IgE-Antwort als Lowresponder klassifiziert, während bei AKR/CU und C3H/DiSn keine spezifische IgE-Produktion nachzuweisen war. Eine schlüssige Antwort auf die Frage, ob es sich bei der mittelhohen Antwort der Rekombinanten B10.A (2R) und B10.A (4R) um eine Komplementation von zwei Ir-Genen oder einen genetischen Einfluß außerhalb von H-2 handelt, kann aufgrund der durchgeführten Untersuchungen noch nicht gegeben werden. Es muß die Feststellung getroffen werden, daß die spezifische IgE-Antwort gegen N.b. neben der Kontrolle durch ein Ir-Gen, das im H-2-Komplex lokalisiert werden konnte, weiteren genetischen Regulationsmechanismen unterworfen ist, die der weiteren Klärung bedürfen.

Im Gegensatz zum antigenspezifischen IgE konnte bei der Untersuchung des totalen IgE keine genetische Abhängigkeit, d. h. Korrelation zwischen H-2-Haplotyp der Mäusestämme und ihrer IgE-Produktion gefunden werden (Kap. D.I.2.). Die Unterschiede zwischen den Basalwerten der IgE-Konzentration bei den nicht infizierten Mäusen (Tab. 8, S. 100) sind ebenso wenig genetisch bedingt wie die im Verlauf der Infektion auftretenden Stammunterschiede (Tab. 9, S.102). Um zu verdeutlichen, daß keine Parallele zwischen der Produktion von spezifischem IgE und dem totalen IgE besteht, wurde auch bei der Untersuchung der unspezifischen IgE-Werte die Einteilung der Mäusestämme in Respondergruppen beibehalten. Diese Klassifizierung hat ihre Berechtigung nur für die spezifische IgE-Antikörperbildung gegen N.b.

Die in Kap. D.I.2. (S. 98) dargelegten Ergebnisse stehen nicht in voller Übereinstimmung mit den im Rattenmodell durchgeführten Untersuchungen über die IgE-Produktion nach N.b.-Infektion. Dort wurden deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen festgestellt. Während Hooded Lister-

Ratten nach parasitärer Infektion IgE-Werte zwischen 100 und 400 $\mu\text{g/ml}$ aufwiesen, lagen die Werte von Wistar-Ratten bei 25 $\mu\text{g/ml}$, von Albino Swiss-Ratten wurden nur 2 bis 3 $\mu\text{g/ml}$ erreicht (Jarrett, 1978; Jarrett und Bazin, 1977). Auch im Schistosoma-Modell konnten Unterschiede in der totalen IgE-Produktion verschiedener Rattenstämme festgestellt werden (Rousseaux-Prévost, Bazin und Capron, 1977). Diese Differenzen zu den hier im Mausmodell durchgeführten Untersuchungen führen zu der Fragestellung, ob es sich hier um Speziesunterschiede (Ratte-Maus) handelt, Zuchtunterschiede in beiden Systemen zu Tage treten oder die Immunisierungsmethode (Larvenzahl; Reinfektionszeitpunkt) als Ursache von Bedeutung sein kann.

Dagegen besteht Übereinstimmung, daß in beiden Nagetierspezies die Infektion bzw. Reinfektion mit N.b. zu einer Potenzierung der IgE-Produktion um das 50- bis 80fache im Vergleich zum Basalwert führt. Der größte Teil des nach einer N.b.-Infektion gebildeten Serum-IgE besteht nicht aus antigenspezifischem IgE (Carson, Metzger und Bloch, 1975). Diese Autoren konnten nach Absorption der spezifischen N.b.-Antikörper durch einen an Sepharose 2B gekuppelten N.b.-Extrakt keinen Abfall des totalen IgE-Titers feststellen. Zu ähnlichen Ergebnissen kam man auch nach Infektion von Ratten mit *Schistosoma mansoni* (Rousseaux-Prévost, Capron, Bazin und Capron, 1978).

Derartige Untersuchungen wurden in der hier vorgelegten Arbeit nicht durchgeführt. Die Verwendung eines Extraktes oder Homogenates adulter N.b.-Würmer zur Absorption von Antikörpern gegen diesen Parasiten aus einem Serum beinhaltet zwei Probleme. Erstens zieht die Verwendung eines Homogenates als Antigen die Konsequenz nach sich, daß damit ein Gemisch von verschiedenen Proteinen verwendet wird. Andererseits ist noch nicht geklärt, welche antigenen Determinanten des Parasiten die Erkennung bzw. die Bindung der IgE-Antikörper bestimmen. Untersuchungen über die antigenen Determinanten von N.b. werden zur Zeit in diesem Labor durchgeführt. Dabei soll diese Fragestellung mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, die gegen den Parasiten gerichtet sind, geklärt werden. Daher wurde auf die Durchführung von Absorptionsexperimenten vorerst verzichtet.

E.I.5. Die Modulation der spezifischen IgE-Antwort in vivo durch Mäuseserum

Es wurde festgestellt, daß bei der Kontrolle der spezifischen IgE-Bildung gegen N.b. ein Ir-Gen involviert ist (Kap. D.1.1.3.1.). Das führt zur Ausprägung von unterschiedlichen IgE-Antworten bei verschiedenen Mäusestämmen. Damit wurde eine weitere Fragestellung induziert: wie kann die differenzierte Antikörperbildung gesteuert werden, liegen humorale oder zelluläre Steuerungsmechanismen zugrunde, sind spezielle Faktoren (vgl. Kap. B.3.3.) in das Netzwerk der IgE-Bildung gegen N.b. integriert?

Auf dieser Basis wurden im System von N.b. Versuche durchgeführt, die in der Anlage denen von der Katz-Arbeitsgruppe (Tung, Chiorazzi und Katz, 1978; Katz und Tung, 1978) sehr ähnlich waren, sich aber in einigen wesentlichen Punkten doch unterschieden. Katz und Mitarbeiter verwendeten andere Mäusestämme (SJL, C57BL/6 sowie (SJL x Balb/c) F1-Hybridmäuse) und teilweise verschiedene Bestrahlungsdosen (150 R, 250 R). Weiterhin führten sie Experimente mit einem Carrier-Hapten-System durch. Gleichzeitig mit der Ganzkörperbestrahlung wurden die Mäuse mit dem Trägerprotein immunisiert (Ascarisextrakt in Aluminiumhydroxyd). Nachfolgend wurde dann die primäre spezifische IgE-Antikörperbildung am zehnten Tag nach Immunisierung mit dem Hapten-Carrier-Konjugat (DNP-Ascaris in Aluminiumhydroxyd) getestet (PCA-Reaktion). Die Sekundärantwort - die spezifische IgE-Bildung am siebten Tag nach zweiter Immunisierung mit DNP-Ascaris - wurde nach dem Transfer von DNP-Ascaris-geprägten Milzzellen in bestrahlten Empfängertieren untersucht.

Hingegen war der Versuchsablauf im N.b.-Modell modifiziert. Nach Bestrahlung und Serumbehandlung der Tiere einige Tage zuvor (Abb. 14), wurden sie mit 750 Larven infiziert und nach vier Wochen reinfiziert. Danach wurde die spezifische IgE-Bildung gegen N.b. zu verschiedenen Zeitpunkten der Reinfektion getestet (Tab. 6, Tab. 7). Die hervorstechendsten Ergebnisse in diesen durchgeführten Experimenten waren:

(1) es zeigte sich ein Stammunterschied zwischen A.TFR5- und B10.M-Mäusen bezüglich der bestrahlungsinduzierten IgE-Antwort,

(2) A.TFR1-Serum steigerte die IgE-Antwort von A.TFR5-Mäusen, B10.G-Serum supprimierte dagegen die IgE-Bildung von B10.M-Mäusen.

Wie können diese Unterschiede geklärt werden? In der Literatur gibt es Befunde, daß die Ganzkörperbestrahlung in einer geringen Dosis bis zu 250 R bei Mäusen zu einer Erhöhung der Antikörper- bzw. IgE-Antwort führt (Dixon und McConahey, 1963; Chiorazzi, Fox und Katz, 1976; DeMacedo und Catty, 1977). Eine Suppression der Antikörperbildung wurde bei einer Bestrahlung mit 300 R gefunden, wenn die Bestrahlung in einem längeren Zeitraum wöchentlich durchgeführt wurde (Hoffsten und Dixon, 1974). Auch führte die Bestrahlung von IgE-Lowrespondern (SJL-Mäuse) zu einer hohen und persistierenden IgE-Antikörperantwort (Watanabe, Kojima und Ovary, 1976; Haya, Okumura, Watanabe und Ovary, 1978).

So gibt es keine Hinweise, warum die IgE-Antikörperantwort bei Bestrahlung mit einer geringen Dosis von 150 R bei A.TFR5-Mäusen zu einer Suppression der IgE-Bildung vom 8. Tag an nach Reinfektion führte. Dagegen erhöhte die durchgeführte Bestrahlung die IgE-Antwort der B10.M-Mäuse (Tab. 7, S. 96), wie es im Vergleich zu den Literaturbefunden erwartet werden konnte.

Das zweite auffällige Ergebnis war die Steigerung der spezifischen IgE-Produktion durch Behandlung der Mäuse mit A.TFR1-Serum (Tab. 6, S. 96). Dieser Effekt kann damit erklärt werden, daß 150 R für A.TFR5-Mäuse eine suboptimale Dosis darstellt und dadurch die Serumbehandlung einen fördernden Effekt zur Folge hatte. Ausgangspunkt zu dieser Überlegung sind die Ergebnisse von Katz, Bargatze, Bogowitz und Katz (1979). Sie fanden eine Verlagerung der optimalen Bestrahlungsdosis - ausgelöst durch die Verwendung unterschiedlicher Apparaturen - von 150 R auf 350 R für SJL-Mäuse. Wurden die Mäuse nun mit der suboptimalen Dosis von 250 R bestrahlt und mit CFA-Immunserum behandelt, zeigte sich ein deutlicher potenzierender Effekt dieses Serums, welches bei optimaler Bestrahlungsdosis suppressierende Wirkung gehabt hatte (Katz, Bargatze, Bogowitz und Katz, 1979). Setzt man daher voraus, daß 150 R für A.TFR5-Mäuse

eine suboptimale Bestrahlungsdosis darstellt (da nur eine begrenzte Anzahl von Versuchstieren zur Verfügung stand, konnten keine Dosis-Wirkungskurven erstellt werden), so wird der potenzierende Effekt des A.TFR1-Serum erklärbar. Andererseits müßte dann 150 R die optimale Dosis für B10.M-Mäuse sein.

Bei der Interpretation der Ergebnisse zur Modulation der antigenspezifischen IgE-Bildung in vivo muß allerdings noch ein weiterer Gesichtspunkt - die genetische Verschiedenheit der verwendeten Mäusestämme - berücksichtigt werden. Es konnte nämlich gezeigt werden (Katz und Tung, 1978), daß die suppressive Aktivität des Serums von mit CFA-immunisierten Lowrespondern stammspezifisch war. Die Inhibition der primären und sekundären - durch Bestrahlung erhöhten - IgE-Antwort von Lowrespondern wurde nur bei Behandlung mit Immunserum von Donormäusen des gleichen H-2-Haplotyps erreicht. Bei Verwendung von Immunseren, die in Mäusen mit unterschiedlichen H-2-Typen induziert worden waren, zeigten sich durch diese Seren keine Einflüsse auf die IgE-Antwort der Empfängertiere.

Im N.b.-System wurden dagegen bei der Verwendung von Immunserum aus Mäusen, die einen anderen Haplotyp als die Empfängermäuse aufweisen, modulierende Einflüsse auf die IgE-Antikörperbildung erzielt. A.TFR1-Serum (H-2^{an1}) erhöhte die IgE-Antwort von A.TFR5-Mäusen (H-2^{ap5}), B10.G-Serum (H-2^q) suppressierte die spezifische IgE-Antikörperproduktion des B10.M-Stammes (H-2^f). Es ist also zu fordern, daß in weiteren Experimenten CFA-Immunserum aus dem gleichen Mäusestamm wie dem der Empfängertiere verwendet wird (z. B. Behandlung von B10.G-Mäusen mit B10.G-Immunserum) und Untersuchungen zur optimalen Bestrahlungsdosis für jeden einzelnen Stamm durchgeführt werden. Dabei sollten als Empfängertiere nicht nur Mäusestämme, die bezüglich der spezifischen IgE-Bildung Highresponder darstellen, getestet werden. Es sollte ebenfalls versucht werden, die IgE-Antwort von Lowrespondern durch Bestrahlung zu erhöhen und dann den Einfluß von Immunserum experimentell zu untersuchen. Weiter ist zu prüfen, ob in den hier untersuchten Mäusestämmen durch Immunisierung mit CFA ebenfalls ein suppressiver Faktor (SFA,

vgl. Kap. B.3.3.2.5.) isoliert und charakterisiert werden kann (Katz und Tung, 1979), der auch im N.b.-Modell inhibierende Wirkung auf die IgE-Bildung hat und - wie im Hapten-Carrier-System - sowohl von High- als auch Lowrespondern gebildet wird (Katz, Bargatze, Bogowitz und Katz, 1980). Das Fazit der Versuche im N.b.-Modell ist, daß in diesem System die antigenspezifische IgE-Bildung in vivo moduliert werden konnte (suppressiv und potenzierend), die Mechanismen dieser Beeinflussung aber noch differenzierter analysiert werden müssen. Dazu gehört auch der Einfluß von Lymphokinen (Kap. B.3.3.3.) auf die antigenspezifische IgE-Produktion.

E.II. Die IgE-Synthese in vitro

E.II.1. Die spontane IgE-Antikörperproduktion im Verlauf der N.b.-Infektion

In der Einleitung (Kap. B., S. 3) wurde anhand einiger Beispiele eingehend beschrieben, daß im Mäusemodell eine Vielzahl von Untersuchungen zur IgE-Antikörperantwort und seiner Regulation durchgeführt worden sind. Ein großes Problem bestand allerdings darin, reproduzierbare und signifikante IgE-Antikörperantworten von Mäuselymphozyten in vitro zu erhalten (Katz, 1982). Ursache ist die geringe Ausprägung von IgE Vorläufer-B-Lymphozyten und die Notwendigkeit einer biologischen Austestung der IgE-Bildung in der PCA-Reaktion. Dort kann nur die antigenspezifische IgE-Produktion erfaßt werden und erst mit der Entwicklung von Radioimmunoassays - nach Generierung von monoklonalem Mäuse-IgE - war es möglich, die totale IgE-Bildung in vitro zu messen. Wie bereits dargestellt wurde (Kap. D.I., S. 73 ; Kap. E.I., S. 186), bildet die N.b.-Infektion einen äußerst starken Stimulus für die antigenspezifische und totale IgE-Synthese auch im Mäusesystem. Daher standen mit dem Modell der N.b.-Infektion eine Vielzahl verschiedener Mäusestämme und mit der Etablierung eines RIA die Voraussetzungen zur Verfügung, Mechanismen der IgE-Regulation auf zellulärer Ebene zu untersuchen.

Bei der Untersuchung nicht behandelter, unstimulierter Mäuse-lymphozyten wurde eine in vitro IgE-Produktion zwischen 10 und 15 ng/ml erhalten (Tab. 14, S. 125). Die sogenannte Spontansynthese war abhängig von der Wahl verschiedener Mäusestämme; es konnte gezeigt werden, daß nach geringer Röntgenbestrahlung (150 R) auch Zellen von Mäusestämmen, die ohne Bestrahlung nur sehr geringe Mengen an IgE produzierten (Balb/c; B10.D2), in gleichem Umfang wie die Highresponder zur IgE-Synthese befähigt waren (Tab. 14). Diese Unterschiede zwischen Mäusestämmen in der Syntheseleistung weichen von der Beobachtung in vivo ab, daß bezüglich des totalen Serum-IgE keine Differenzen festzustellen waren (Tab. 8). Allerdings muß beim Vergleich der Ergebnisse berücksichtigt werden, daß in vitro nur Zellen aus Milzen und mesenterialen Lymphknoten verwendet wurden. Es ist nicht auszuschließen, daß die Zellen verschiedener Mäusestämme möglicherweise unterschiedlich von dem im verwendeten RPMI 1640-Medium zugesetzten FCS (vgl. Kap. C.I.4.) stimuliert wurden. Ein Vergleich der Spontansynthese verschiedener Mäusestämme unter Verwendung von RPMI 1640-Medium, das nicht mit FCS sondern äquivalenten Zusätzen angereichert ist (Kristensen, Walker, Müller und DeWeck, 1982), sollte darüber Aufschluß geben können.

Wahrscheinlicher ist allerdings die Regulation der IgE-Synthese in vitro durch T-Suppressorzellen. Es wurde nämlich gezeigt, (Teale, Liu und Katz, 1981), daß kein wesentlicher Unterschied in der Zahl von B-Zellen, die durch Antigen zur Produktion IgE-sezernierender Zellklone stimuliert werden konnten, bei sogenannten High- und Lowresponder Mäusestämmen besteht. Die nach Bestrahlung erhöhte Spontansynthese der Lowrespondermäuse (Tab. 14, S. 125) kann daher durch das Ausschalten einer Suppressorzellpopulation bedingt sein, wie es in vivo in mehreren Experimentalmodellen (Kap. B.3.3.1.) gezeigt wurde.

Die Spontansynthese der verwendeten Mäusestämme war 50fach höher als die von Katz (1982) angegebenen Werte. Allerdings wurden bei den Untersuchungen dieses Autors ein anderer Tierstamm (CAF₁-Mäuse) und eine geringere Zellkonzentration ($0,5 \times 10^6$ Zellen pro 0,25 ml Medium in Mikrokulturplatten) ver-

wendet. Die hier durchgeführten Tests hatten dagegen eine optimale Zelldichte von 5×10^6 Zellen/1 ml Medium bei Verwendung des Makrowell-Systems ergeben (Abb. 20). Die Meßgenauigkeit im hier verwendeten RIA war bei Konzentrationen, die unter 1 ng/ml lagen, nicht mehr gesichert; dagegen gibt Katz (1982) auch Konzentrationen von 10 pg/ml an. Es stellt sich die Frage, inwieweit beide Systeme des RIA vergleichbar sind.

Die Infektion bzw. Reinfektion mit N.b. führte zu einem signifikanten Anstieg der IgE-Synthese in vitro (Tab. 14). Im Gegensatz zu der erheblichen Steigerung des Serum-IgE nach Erstinfektion zeigte sich in vitro keine äquivalente Erhöhung der IgE-Produktion. Erst nach der Sekundärinfektion wurde in vitro eine merklich erhöhte IgE-Synthese beobachtet. Es kann ausgeschlossen werden, daß diese Steigerung größtenteils durch parasitenspezifische Antikörper bedingt ist. Nach Reinfektion steigt zwar die Bildung von antigenspezifischem IgE, der Anteil des spezifischen am Gesamt-IgE bleibt gering; dies wurde durch den nur in wenigen Experimenten erbrachten Nachweis von IgE-Antikörpern, die spezifisch gegen N.b. gerichtet waren, in vitro erhärtet (Kap. D.II.2.).

E.II.2. Der Einfluß verschiedener Mitogene auf die IgE-Synthese

Nach Untersuchung der Spontansynthese von Mäuselymphozyten im Infektionszyklus mit N.b. stellte sich die Frage, ob die Immunglobulin-Synthese der Zellen durch Zugabe verschiedener Mitogene beeinflußt werden konnte. Im Rattenmodell sind Untersuchungen über die Stimulation von Zellen im Laufe der Infektion mit ConA durchgeführt worden (Bloch, Towle und Mills, 1977; Stockinger, 1979). Dieses Mitogen war in der Lage, den ^3H -Thymidineinbau von Rattenzellen zu stimulieren; gleiche Ergebnisse wurden auch im Mäusemodell erhalten (Young, 1982 a, b). In vitro konnte auch die Immunglobulinsynthese bzw. Antikörperproduktion von Mäusezellen durch LPS induziert werden (Andersson, Sjöberg und Möller, 1972), was ebenfalls für PWM gezeigt wurde (Kina, Nishikawa und Katsura, 1982 a, b). Dieses Mitogen wird auch zur Stimulation der Immunglobulinsynthese im Humanmodell

(Stevens, 1981) und besonders zur Stimulierung der IgE-Antwort (Zuraw, Nonaka, O'Hair und Katz, 1981) verwendet. Daher sollten die Einflüsse dieser Mitogene speziell auf die IgE-Synthese im Mäusesystem und im Modell der Infektion mit N.b. untersucht werden.

Die im Kapitel D.II.3.3.2. (S. 127) dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die drei untersuchten Mitogene ConA, LPS und PWM in der Lage waren, die in vitro IgE-Synthese zu beeinflussen. Die stärkste mitogen-induzierte Steigerung der IgE-Bildung wurde durch Zellen aus nicht N.b.-infizierten Mäusen erhalten (Tab. 15, S.144). PWM und LPS waren stärkere Stimuli für die IgE-Synthese als ConA, das stärker suppressive Effekte bewirkte (Tab. 16). Weiterhin wurde deutlich, daß die durch ein Mitogen induzierte erhöhte IgE-Synthese generell nicht den maximalen Wert der Spontansynthese von Zellen N.b.-infizierter bzw. -reinfizierter Mäuse übertraf (Beispiel: Abb. 22). Dies zeigt, daß auch in vitro die polyklonale Stimulierung der B-Zellen durch die parasitäre Infektion nachgewiesen werden kann. Die Zellen werden durch die N.b.-Infektion derart aktiviert, daß der Zusatz von Mitogenen keine größeren Einflüsse auf die IgE-Synthese hat, da die Zellen schon maximal stimuliert sind. Dagegen findet durch Mitogengabe zu nicht N.b.-infizierten Mäuselymphozyten noch eine Stimulation der Zellen zur verstärkten IgE-Synthese statt, die die maximale Biosynthese - ausgelöst durch N.b.-Infektion - aber nicht übertreffen kann.

Es soll nicht versucht werden, eine genaue Analyse der aufgetretenen suppressiven oder steigernden Effekte der Mitogene in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der N.b.-Infektion zu erstellen. Dazu waren die untersuchten Zellpräparationen zu komplex. Auch war keine Unterteilung in Milz- und Lymphknotenzellsuspensionen vorgenommen worden, das wäre für eine genaue Analyse der einzelnen Mitogeneinflüsse notwendig. So ist zum Beispiel nachgewiesen worden (Kina, Nishikawa und Katsura, 1982 a) , daß die durch PWM induzierte polyklonale Immunglobulinproduktion von T-Helferzellen abhängig ist. Dabei bestand die Abhängigkeit bei B-Zellen aus der Milz nur teilweise, bei B-Zellen aus Lymphknoten jedoch vollständig.

Weiterführend wären daher Experimente mit genau definierten Zellpopulationen notwendig, um die Regulation der Mitogenwirkung auf die IgE-Synthese zu analysieren. Wie gezeigt wurde, erwies sich das Modell der parasitären Infektion mit N.b. als sehr gutes System zur Stimulierung einer guten IgE-Produktion *in vitro*. Darauf basierend erscheinen zukünftige Experimente zur Analyse der IgE-Synthese *in vitro* über die Einflüsse von Makrophagen und der verschiedenen T-Zellsubpopulationen auf die Produktion dieses Immunglobulins gut durchführbar.

E.II.3. Die Wirkung von parasitären Antigenen

In diesen Versuchsreihen (Kap. D.II.3.3.) wurde untersucht, ob die Präparation eines Wurmhomogenates bzw. der zellfreie Wurm-kulturüberstand einer viertägigen Kultur mit adulten N.b.-Würmern Einflüsse auf die IgE-Synthese oder die Lymphozytentransformation ausüben können. Wie einleitend schon erwähnt wurde (Kap. B.3.2.2.) führt die Infektion mit N.b. auch zu einer Potenzierung der IgE-Antwort gegen nicht parasitäre Antigene (z. B. Ovalbumin). Dabei konnte diese Erhöhung der IgE-Antwort im Ratten- und Mäusemodell nicht durch *in vitro* sezernierte Wurmbestandteile oder totes Wurmantigen induziert werden.

Auch bei den Untersuchungen der IgE-Synthese *in vitro* zeigte sich (D.II.3.3.), daß nur eine geringe Modulation der Antikörperbildung durch beide Antigene erreicht werden konnte. Diese war deutlich geringer als die durch Mitogene erzielten Effekte. Die IgE-Synthese wurde von Homogenat oder Kulturüberstand maximal bis zu 30 % inhibiert oder erhöht (Abb. 31, Abb. 35) und auch die Lymphozytenproliferation wurde weit weniger beeinflusst als durch ConA, PWM oder LPS (Abb. 36, Abb. 37). Hierbei muß angemerkt werden, daß bei den Versuchen zur Lymphozytenstimulation nur der reine Einfluß beider Wurmantigene untersucht wurde. Die Stimulierung der Zellen wurde mit der ³H-Thymidin-Einbaurrate von Kontrollzellen, die ohne jeglichen Zusatz im Medium kultiviert worden waren, verglichen. Es wurden keine Experimente durchgeführt, in denen die Zellen erst für eine bestimmte Zeit mit Wurmantigen inkubiert und - nach Herauswaschen des Antigens - danach der Einfluß von Mitogenen

auf die Stimulierbarkeit getestet wurde. Die Versuche zur Zellproliferation dienten in erster Linie als Kontrollsystem und Vergleich zur Funktionsfähigkeit der Zellkulturen in der IgE-Synthese. Diese wurde jeweils nur unter Zusatz von einem Antigen oder Mitogen überprüft; es zeigte sich erneut, daß die Stimulation der IgE-Antikörperbildung im weitesten Umfang durch die Infektion mit N.b. erfolgte und parasitäre Antigene in vitro nur sehr geringe Effekte hatten.

Da Untersuchungen in vitro zur IgE-Synthese im Mäusemodell erst in der Anfangsphase stehen, liegen vergleichbare Ergebnisse zu dem Aspekt der Parasitenantigene auch in anderen parasitären Modellen noch nicht vor. Es wurden lediglich Arbeiten auf diesem Gebiet über die Einflüsse von Wurmantigenen auf die Lymphozytenproliferation durchgeführt.

Stockinger (1979) fand, daß Wurmhomogenat auf die Stimulation von MLN-Zellen nicht N.b.-infizierter Ratten keine Wirkung hatte. Dagegen konnte er einen Überstand von kultivierten Würmern gewinnen, der die PHA-Stimulation von MLN-Zellen suppressierte (PHA ist ein T-Zellmitogen). Es konnte weiter gezeigt werden, daß dieser Wurmkulturüberstand in T-Zell-angereicherten Kulturen sowie auf Zellen infizierter und reinfizierter Ratten eine noch stärkere suppressive Wirkung hatte. Bloch, Towle und Mills (1977) fanden eine starke Zunahme der Thymidineinbaurate von MLN-Zellen im Laufe der Infektion von Ratten mit N.b., wenn diese Zellen mit einem Wurm-Kulturüberstand stimuliert wurden; Milzzellen blieben dagegen unbeeinflusst.

Im parasitären Modell der Schistosomiasis konnte gezeigt werden, daß die B- und T-Zellproliferation durch einen zellfreien Kulturüberstand (Kultur von adulten Würmern über drei bis vier Tage) zu inhibieren war (Dessaint, Camus, Fischer und Capron, 1977). Diese Suppression der durch B- und T-Zellmitogene LPS, ConA und PHA induzierten Zellstimulation konnte auf parasitäre Faktoren zurückgeführt werden, die hitzeresistent und dialysierbar waren und ein geringes Molekulargewicht (500 - 1000 dalton) hatten.

Die T-Zell-vermittelte, antigenspezifische Lymphozytentransformation wurde im Mäusemodell demonstriert (Campbell, Esser und Phillips, 1982). Nach Immunisierung mit *Trypanosoma rhodiense* wurde die Lymphozytenproliferation von Milzzellen bei Zugabe von Trypanosomenantigen (Überstand einer sonkierten Trypanosomenpräparation) untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Proliferation der T-Zell-angereicherten Population erhöht wurde im Vergleich zur Gesamtzellpopulation bzw. der B-Zellen. Auch stieg der Stimulationsindex ConA-stimulierter Zellen erheblich. Wurde dagegen der Antigeneinfluß auf die Zellproliferation nicht immunisierter Zellen untersucht, konnte eine nicht-spezifische, d. h. polyklonale Stimulierung von B-Zellen gezeigt werden. In diesen Experimenten erwies sich eine Antigenkonzentration von 100 µg/ml als die optimale Dosis; dagegen wurden bei den hier vorgelegten Untersuchungen im N.b.-Modell weitaus geringere Konzentrationen (1 - 10 µg/ml) verwendet. Im System der Trypanosomiasis wurden durch Antigenzusatz Stimulationsindices erzielt (SI = 2 - 8), die nur wenig höher waren, als es hier für Mäusezellen aus der N.b.-Infektion demonstriert werden konnte (Abb. 36, Abb. 37; SI = 3 - 4). Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Campbell, Esser und Phillips (1982) wurde im N.b.-System - wie bereits erwähnt - keine Aufspaltung in Zellsubpopulationen vorgenommen. Es wäre daher zu prüfen, ob die im Trypanosomiasis-Modell erarbeiteten Resultate auf die Infektion mit N.b. übertragbar sind. Wie schon im vorherigen Kapitel angedeutet, sollten bei weiteren Untersuchungen der IgE-Synthese unter Einfluß von Parasitenantigenen auf zellulärer Ebene die Rolle verschiedener Zellpopulationen (Makrophagen, B- und T-Zellen) und ihr Zusammenwirken mit parasitären Fraktionen näher analysiert werden.

E.II.4. Die Modulation der IgE-Synthese durch Mäuseserum bzw. Serumfraktionen

In den Experimenten zur Wirkung von Mäuseseren auf die IgE-Synthese sollte überprüft werden, ob modulatorische Effekte, wie sie in vivo bei der spezifischen IgE-Antwort gegen N.b. (Kap. D.I.1.2.) gefunden worden waren, auch in vitro erzeugt werden konnten. Dazu muß in Erinnerung gerufen werden, daß bei den Untersuchungen in vitro die totale IgE-Synthese gemessen

wurde und die Wirkung von Serum unbehandelter, nicht infizierter und nicht immunisierter Mäuse getestet wurde. Dagegen stammten die Lymphozyten, deren IgE-Bildung beeinflußt werden sollte, sowohl aus nicht infizierten als auch aus N.b.-infizierten Mäusen.

Diese Prämissen sollten noch einmal in den Vordergrund gestellt werden, da es eine Reihe von Untersuchungen über Serumeffekte gibt, die in teilweise sehr verschiedenen Modellen mit unterschiedlichen Konzeptionen durchgeführt wurden. Die hier vorgelegten Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die Serumwirkung in der IgE-Antikörperproduktion; begleitend wurden ebenfalls Experimente zur Lymphozytenproliferation unter Serumeinfluß ausgeführt. Die wesentlichen Ergebnisse sollen nachfolgend mit den Befunden anderer Autoren verglichen werden, wobei *in vitro* Untersuchungen zur IgE-Synthese unter diesem Gesichtspunkt noch nicht durchgeführt wurden. Es wurde lediglich gezeigt, daß die Induzierung von Mäuselymphozyten, die Fc-Rezeptoren für IgE auf der Oberfläche tragen, durch Behandlung mit SFA ('suppressive factor of allergy') supprimiert werden kann (Chen, Bohn, Liu und Katz, 1981; Bohn, Chen, Liu und Katz, 1982).

In den hier durchgeführten Experimenten zeigte sich, daß Mäuseren genetisch verschiedener Stämme, welche nach N.b.-Reinfektion unterschiedliche antigenspezifische IgE-Antworten ausprägen (Balb/c, B10.G, A.CA), suppressive Wirkung auf die IgE-Synthese von Mäuselymphozyten haben (Abb. 38 - 40, Tab. 17 - 18). Auch kann die Lymphozytentransformation inhibiert werden (Abb. 41). Nach Auftrennung von Seren (Balb/c, B10.G, B10.D2) durch Ammoniumsulfatpräzipitation erwiesen sich die 33 %- und 50 %-Präzipitate als inhibitorisch für die IgE-Synthese (Abb. 43, Abb. 44; Tab. 19). Die Lymphozytenproliferation wurde dagegen auch von der 70 %-Präzipitatfraktion inhibiert (Tab. 20).

Die Untersuchungen von Veit und Michael (1973) demonstrierten einen Seruminhibitor im Serum von nicht immunisierten Mäusen, der die Immunantwort von Milzzellen gegen Schafserythrozyten supprimiert. Dabei wurde die Inhibition nur wirksam, wenn das

Serum innerhalb der ersten 48 Stunden nach Kulturbeginn zugesetzt worden war. Eine Erhöhung der Suppression wurde durch Verwendung eines Serums von Mäusen erreicht, die zuvor mit Pferdeerythrozyten immunisiert worden waren. Nach 60 %iger Ammoniumsulfatpräzipitation zeigte sich im Präzipitat keine suppressive Aktivität. Nach Auftrennung des 60 %-Überstandes über eine Sephadex G-200-Säule wurde danach mit zwei von drei Peakfraktionen eine inhibitorische Aktivität erreicht, die konzentrationsabhängig war. Die Reduktion lag zwischen 75 und 96 % bei Einsatz einer Proteinkonzentration von 0,1 bis 1 mg.

Es zeigt sich also ein wesentlicher Unterschied zu der Serumwirkung auf die IgE-Synthese; es fanden sich dort die inhibitorischen Effekte in den 33 %- und 50 %-Präzipitaten, Veit und Michael (1973) wiesen eine Suppressivität im 60 %-Überstand nach. Berechnet man die Suppressivität des Inhibitors, der von diesen Autoren beschrieben wurde (Prozent Suppression pro μg Protein = 0,1), so ist diese geringer als die der Serumfraktionen für die IgE-Synthese (Abb. 45 und 46; Suppressivität = 0,2 - 0,4 bzw. 1,0 - 2,5).

Weitere Untersuchungen wiesen nach (Smith und Hammarström, 1979), daß Mäuseserum die durch die B-Zellmitogene LPS und PPD induzierte Zellproliferation sowie die polyklonale Aktivierung von 'plaque-forming-cells' modulieren kann, was auch bei unstimulierten Kulturen nachgewiesen werden konnte. Es zeigte sich allerdings eine deutliche Dosisabhängigkeit. Während Serumzusatz von 10 % und mehr suppressiv wirkte, führte ein Anteil von 0,1 - 1 %igem Serum zu einer leichten Stimulation. Dies konnte bei der Untersuchung der IgE-Antwort nicht bestätigt werden (Tab. 17 und 18). Hier induzierte der Zusatz von 0,1 - 1 % Serum eine deutliche Suppression der IgE-Produktion und auch teilweise der Lymphozytentransformation (Abb. 41).

Die konzentrationsabhängige Inhibition einer unstimulierten oder durch Mitogene (PHA, ConA, LPS) stimulierten Zellproliferation von Milzzellen verschiedener Mäusestämme (A/J, CBA/J, CBA/H, (CBA/J x A/J) F1) wurde in Untersuchungen von Nelson und Schneider (1974) demonstriert. Bei Zugabe von 5 %igem Mäuseserum

lag die durchschnittliche Suppression der Lymphozytenproliferation bei 50 - 60 %. Dies ist vergleichbar mit der Wirkung von 1 %igem Serum auf Zellen von Mäusen in der N.b.-Infektion (Abb. 41).

Im Rattenmodell wurde der Einfluß von normalem Rattenserum und Serum von N.b.-infizierten Tieren auf die PHA-Stimulationsrate von Ratten-MLN-Zellen getestet (Stockinger, 1979). Dabei zeigte sich, daß Seren, die fünf bis vierzehn Tage nach Infektion gewonnen wurden, eine 50 %ige Suppressivität aufwiesen, während mit normalem Rattenserum keinerlei Einfluß auszuüben war; dies galt ebenso für Serum, das vier Wochen nach der Infektion gewonnen wurde. Der Autor konnte zeigen, daß im Serum der infizierten Ratten Komplexe vorhanden sind, die nach Anlagerung an adhärente Zellen zu einer Suppression der Mitogenstimulierbarkeit normaler MLN-Zellen führen. Nach Ammoniumsulfatpräzipitation von infiziertem Serum (33 %, 40 %, 50 %, 70 %) zeigte dessen 40 %- und 50 %-Präzipitat eine deutliche Suppression der Proliferationsrate im Gegensatz zum Normalserum, dessen Fraktionen (40 %, 50 %) keine inhibierende Wirkung zeigten.

Dies läßt sich bei Seren nicht infizierter Mäuse bzw. deren Ammoniumsulfatpräzipitaten nicht bestätigen, wo auch die 33 %- bis 50 %-Fraktionen deutliche inhibierende Wirkung auf die Lymphozytenproliferation zeigten (Tab. 20). Allerdings wurde hier nur die Spontanstimulation untersucht, nicht die durch Mitogene (ConA, PHA) stimulierte Proliferation. Darüberhinaus wurden Gesamtzellpopulationen aus Milz- und MLN-Zellen verwendet und keine Mäuseseren von Tieren, die mit N.b. infiziert waren. Der Einfluß von Seren (bzw. deren Fraktionen) aus der N.b.-Infektion auf die IgE-Synthese bzw. Lymphozytenproliferation sollte in zukünftigen Experimenten dazu beitragen, neue Erkenntnisse über die Beteiligung spezifischer parasitärer Faktoren an der IgE-Regulation zu gewinnen. Eine weitere Auftrennung und biochemische Charakterisierung der Komponenten, die in der 33 %- bzw. 50 %-Präzipitatisfraktion zur Suppression der IgE-Synthese führen, ist ebenfalls zu fordern.

Es sollte auch geklärt werden, ob Lipoproteine an der Suppression der IgE-Bildung beteiligt sind. Die inhibitorische Wirkung dieser Serumbestandteile auf die mitogeninduzierte Lymphozytenproliferation wurde im Mäusemodell nachgewiesen (Hsu, Ghanta und Hiramoto, 1981). Die modulierende Wirkung von α - und γ -Globulinen sowie Albumin auf die ConA- und PHA-induzierte Lymphozytenstimulation konnte im Meerschweinchensystem gezeigt werden (Neveu, Perdoux und Reiss, 1982); es stellt sich die Frage, inwieweit diese Serumbestandteile bei der Suppression der IgE-Synthese im Mäusesystem ebenfalls beteiligt sein könnten. Wenn ein löslicher Faktor oder ein definierter Serumbestandteil isoliert werden kann, der in die Regulation der IgE-Synthese auf zellulärer Ebene eingreift und auch unter Umständen spezifisch in dem hier etablierten System der parasitären Infektion mit N.b. auf die IgE-Bildung wirkt, könnte das zu weiteren Aufschlüssen über immunregulatorische Interaktionen führen.

E.II.5. Relevanz der experimentell gefundenen Daten für die bestehenden Vorstellungen über die IgE-Regulation unter besonderer Berücksichtigung der IgE-Bildung bei parasitären Infektionen

Aus den bisher erfolgten Untersuchungen auf dem Gebiet der Immunologie, die die zellulären und genetischen Mechanismen der Immunantworten umfaßten, ergibt sich die Vorstellung, daß das immunologische System aus einem äußerst fein abgestimmten System verschiedener Zellen besteht, die untereinander in einem dynamischen Netzwerk durch verschiedene Kreislautsysteme und direkte Einwirkungen aufeinander in Verbindung stehen.

Wie schon in der Einleitung dargestellt wurde, bildet das Zusammenspiel von T-Helferzellen und B-Lymphozyten die Vorbedingung für die Antikörperbildung gegen die meisten Proteinantigene, d. h. T-Zellabhängigen Antigene. Dabei sind die B-Lymphozyten diejenigen Zellen, die zu Antikörper-sezernierenden Zellen ausdifferenzieren; die verschiedenen Subpopulationen von T-Lymphozyten sind dagegen für die Kontrolle des Umfangs und

Ausprägung der Antikörperantwort verantwortlich. Weiterhin hängt die Auslösung einer Immunantwort davon ab, ob ein T-Zell-abhängiges Antigen von phagozytierenden Zellen umgewandelt wurde, bevor es den B-Zellen angeboten oder von den Makrophagen diesen Zellen präsentiert wird.

Eine sehr wichtige Entdeckung im Laufe der Untersuchungen des Immunsystems war bei der Analyse von Inzuchtmäusen gemacht worden: die Immunantwort gegen ein Antigen kann unter genetischer Kontrolle stehen und Ir-Gene sind im MHC der Maus auf dem Chromosom 17 lokalisiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die verschiedenen T-Zellsubpopulationen ihre Effekte auch über lösliche Faktoren vermitteln können. Man kann aus verschiedenen immungenetischen Studien schließen, daß die genetische Struktur eines Individuums die Ausprägung desjenigen T-Zelltyps (T-Helfer- bzw. T-Suppressorzellen) kontrolliert, der in der Immunantwort gegen ein bestimmtes Antigen vorherrscht (Sehon, 1982): HR-Mäuse produzieren keine Suppressorzellen nach Immunisierung während in NR-Mäusen antigenspezifische Suppressorzellen vorherrschen. Es besteht somit die Vorstellung, daß einige Ir-Gene die Differenzierung der antigenreaktiven T-Zellen zu Helfer- oder Suppressorzellen bestimmen. Dabei werden durch die HR-Allele die Helferzellen, durch die NR-Allele die Suppressorzellen bevorzugt gebildet.

Dieses Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren und Regulationsmechanismen wird in großem Umfang bei vielen parasitären Infektionen untersucht. Besonders die Wurminfektionen verursachen eine erhöhte IgE-Produktion und eine potenzierte IgE-Bildung gegen nicht-parasitäre Antigene. Es wurde schon auf die T-Zell-abhängigkeit dieser Eigenschaften hingewiesen (Kap. B.2.2.) und man wendet sich jetzt in starkem Maße der Untersuchung von regulatorischen T-Zellsubpopulationen bzw. deren löslichen Produkten zu. Dabei wurden bisher systematische Studien über genetische Einflüsse auf die Unterschiede in der Ausprägung spezifischer IgE-Antworten bei Wurminfektion noch nicht durchgeführt (Mitchell et al., 1982). Für die Regulation der IgE-Antwort bei Infektion mit Darmparasiten ist die Kenntnis von

isolierten Allergenen sehr wichtig, um die IgE-Produktion der antikörpersezernierenden bzw. Vorläufer-Zellen quantitativ bestimmen zu können. Die Isolierung von Wurmantigenen ist zur Untersuchung der Zahl und des Aufenthaltsortes der parasitenspezifischen IgE-sezernierenden Zellen sowie der Häufigkeit der B_ε-Zellen nötig. Es gibt nämlich sekundäre Vorgänge, die den Anteil der zirkulierenden IgE-Antikörper, die in der PCA-Reaktion genau bestimmt werden, verändern können. Dazu gehört die Anlagerung an Mastzellen, Basophile, Makrophagen und Fc-Rezeptor-tragende Zellen; auch die Bildung von Immunkomplexen kann die IgE-Konzentration im Serum beeinflussen. Von weiterer Bedeutung ist das Phänomen, daß die IgE-potenzierende Wirkung von Infektionen nicht mit allen injizierten Allergenen auszulösen ist und viele Versuche, eine IgE-Antwort mit Parasitenextrakten zu erhöhen, fehlgeschlagen sind. Nur lebende Würmer sind dazu in der Lage.

Es gibt auch noch keine eindeutige Erklärung für die einzigartige polyklonale Stimulierung der IgE-Antwort in parasitären Infektionen. Die Vorstellungen über die Regulation des parasitenspezifischen und nichtspezifischen IgE sind schon weit entwickelt (Jarrett und Miller, 1982). So führt in einem Kreislauf der Kontakt des Parasiten mit antigenspezifischen IgE-B-Zellen zur Differenzierung dieser Lymphozyten zu spezifischen IgE-Plasmazellen, die antigenspezifisches IgE sezernieren. Gleichzeitig setzen antigenspezifische T-Zellen IgE-potenzierende Faktoren frei; diese stimulieren T-Zellen für nicht antigenspezifische IgE-Antworten; die T-Helferzellen beeinflussen ebenso antigenunspezifische B-Zellen, wie der von den antigenspezifischen T-Zellen ebenfalls produzierte T-Zell-Replacing-Faktor (TRF). Die Produktion des IgE 'B-cell-generating-factor' (BCGF) führt zur Weiterdifferenzierung der B-Zellen in ε-tragende Zellen. Andererseits differenzieren antigenunspezifische B-Zellen zu IgE-sezernierenden Plasmazellen und produzieren polyklonales IgE, welches die Ausbildung von Fc_ε-Rezeptoren auf T-Zellen beeinflußt. Diese wiederum setzen potenzierende und supprimierende IgE-bindende Faktoren frei, die auf antigenunspezifische B-Zellen wirken. Es stellt sich nun die Frage, wie

die im System der N.b.-Infektion von Inzuchtmäusen erarbeiteten Befunde in das beschriebene System eingefügt werden können. Die genetische Regulation der IgE-Produktion, repräsentiert durch die Kontrolle der Highresponder über ein Ir-Gen, greift in den Kreislauf der antigenspezifischen IgE-Antikörperproduktion ein. Dagegen unterliegt die polyklonale Steigerung der IgE-Produktion nach N.b.-Infektion keiner genetischen Kontrolle. Die Modulation der spezifischen IgE-Bildung in vivo durch Mäuseseren wirkt ebenfalls in diesem Kreislaufsystem. Dabei ist noch nachzuweisen, ob es sich um eine direkte Beeinflussung von B-Zellen oder um einen Mechanismus über T-Zellsubpopulationen handelt.

Die Untersuchungen in vitro bestätigten, daß die parasitäre Infektion für die totale IgE-Synthese einen großen Aktivator darstellt. Hier eröffnen sich noch einige Möglichkeiten, durch Auswahl und Zusammensetzung verschiedener Zellpopulationen, die Wirkung der beschriebenen Faktoren in vitro auf die antigenun-spezifischen B-Zellen weiter zu analysieren. Auch sollte versucht werden, Parasitenantigene zu charakterisieren, um die Regulation der antigenspezifischen T- und B-Zellen weiter analysieren zu können. Wie die Experimente gezeigt haben, gibt es Serumkomponenten bzw. -faktoren, die auch auf die totale IgE-Synthese einwirken und es müssen folgende Fragen geklärt werden:

- (1) welche biochemischen Charakteristika besitzen diese Faktoren,
- (2) wo und von welchen Zellen werden sie gebildet,
- (3) welche Spezifität besitzen sie und
- (4) wo greifen sie bei der polyklonalen B-Zellaktivierung und IgE-Synthese ein?

Die durchgeführten Untersuchungen im immunparasitologischen Modell der Infektion von Inzuchtmäusen mit dem Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis* haben gezeigt, daß die Bildung von spezifischem IgE einer genetischen Regulation unterliegt. Neben den bisher beschriebenen Ir-Genen, welche die IgE-Bildung gegen synthetische Polypeptide, Ovalbumin, 'Ragweed' oder auch den

Protozoen *Trichomonas vaginalis* kontrollieren (vgl. Kap. B.4.), wurde hier auch ein Ir-Gen für die hohe spezifische IgE-Antwort gegen N.b. beschrieben. Es zeigte sich, daß mit dem Modellsystem der N.b.-Infektion eine gute Grundlage geboten wird, die IgE-Antikörperproduktion eingehend zu untersuchen. Die N.b.-Infektion führt zu einem polyklonalen Anstieg der IgE-Bildung und ermöglicht es, regulative Vorgänge der IgE-Synthese auch in vitro zu analysieren. Die Modulation der spezifischen IgE-Synthese in vivo und die Suppression der totalen IgE-Antikörperproduktion in vitro durch Mäuseseren zeigt, daß mit diesem System weitere Beiträge zur Regulation der IgE-Antwort gewonnen werden können. Dabei werden in Zukunft weitere Untersuchungen in vitro, die auf der zellulären Ebene die Einflüsse verschiedener Serumfaktoren experimentell erfassen können, von Bedeutung sein. Es ist zu klären, ob bestimmte Zellpopulationen auch im Mäusemodell bei der Bildung von Faktoren beteiligt sind, von denen die IgE-Antwort regulativ beeinflußt wird. Nicht zuletzt muß überprüft werden, welche Rolle parasitenspezifischen Faktoren, die noch charakterisiert werden müssen, bei der Induktion der IgE-Synthese zukommt und welche antigenen Determinanten zur IgE-Antikörperantwort in diesem Modellsystem beitragen. Aus der Summe der Antworten dieser Fragestellungen sollte es dann möglich sein, weitere Erkenntnisse über die Netzwerkinteraktionen im System der IgE-Antikörperbildung zu gewinnen und letztendlich einen Beitrag zur Therapie der IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen leisten zu können.

F. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden

- (I) die genetische Abhängigkeit der IgE-Produktion in vivo,
- (II) die Modulation der antigenspezifischen IgE-Antikörperantwort in vivo und
- (III) die IgE-Synthese sowie deren Modulation in vitro

im immunparasitologischen Modell der Infektion von Inzuchtmäusen mit dem Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis* untersucht.

(1) Es wurde gezeigt, daß von 36 Mäusestämmen, die mit 750 Larven des Parasiten infiziert und nach vier Wochen reinfiziert worden waren, 13 Stämme in der sekundären Immunantwort antigenspezifische Antikörper der IgE-Klasse bildeten (Tab. 1 a, 1 b). In Korrelation zu der maximalen Antikörperproduktion wurden die Mäusestämme in Respondergruppen eingeteilt. Diese verschiedenen Responder (HR, MR, LR) zeigten auch eine unterschiedliche Zeitkinetik der IgE-Bildung (Abb. 9 bis 11), wobei nur die HR-Stämme drei Wochen nach Reinfektion noch N.b.-spezifische Antikörper im Serum aufwiesen.

(2) Der Nachweis einer genetischen Regulation über den H-2-Komplex konnte geführt werden. Ein Ir-Gen für N.b., verantwortlich für eine hohe antigenspezifische IgE-Produktion, wurde zwischen dem K- und J-Lokus postuliert. Die hohe Sekundärantwort gegen den Parasiten ist auf Mäuse mit dem f-Haplotyp beschränkt (Tab. 3). Es wurden auch nur von Tieren dieses Haplotyps spezifische IgE-Antikörper in der Primärinfektion gebildet (Tab. 1 b). Eine weitere genetische Kontrolle, außerhalb des H-2-Komplexes, muß ebenfalls vorliegen, da Mäuse gleichen Haplotyps unterschiedliche bzw. keine IgE-Antwort gegen N.b. zeigen (Tab. 3). Es wurde weiterhin der Nachweis erbracht, daß die Infektion mit N.b. in allen Stämmen erfolgreich war, d. h. eine Entwicklung vom infektiösen dritten Larvenstadium bis zum adulten Wurm im Intestinum der Tiere stattfand (Tab. 2).

(3) Kreuzungsexperimente zwischen HR- und NR-Stämmen führten in der F1-Generation zur Bildung von mittelhohen Antikörpertitern nach N.b.-Reinfektion. Dabei war die große Zahl von

Einzeltieren auffällig, bei denen keine IgE-Antikörper gegen N.b. nachzuweisen waren (Tab. 7, Tab. 5).

(4) Nach Durchführung dieser grundlegenden Untersuchungen über die spezifische IgE-Bildung im Mäusemodell bei der N.b.-Infektion wurde versucht, die IgE-Antwort in vivo zu modulieren. Es zeigte sich, daß normales Mäuseserum bzw. Serum eines NR-Stammes, der mit CFA immunisiert worden war, die antigenspezifische IgE-Bildung eines genetisch verschiedenen HR-Stammes erhöhen konnte (Tab. 6). Andererseits wurde die durch Bestrahlung weiter erhöhte IgE-Bildung von HR-Mäusen durch Behandlung mit LR-Serum supprimiert (Tab. 7). Eine Interpretation dieser Ergebnisse, die teilweise von denen einer anderen Arbeitsgruppe (Tung, Chiorazzi und Katz, 1978) in einem ähnlichen Modell divergieren, wurde in Kapitel E.I.5. vorgenommen.

(5) Durch die Etablierung eines quantitativen Radioimmunoassays zur Messung von Mäuse-IgE war es möglich, die Konzentration des totalen IgE im Serum zu bestimmen. Es wurde dargestellt; daß bei nicht N.b.-infizierten Mäusen der durchschnittliche IgE-Gehalt im Serum bei 350 ng/ml liegt (Tab. 8). Nach N.b.-Infektion kommt es zu einem polyklonalen Anstieg um das 30fache auf 10 µg/ml bzw. nach Reinfektion wurde eine 50fache Steigerung der IgE-bildung auf 18 µg/ml festgestellt (Tab. 9). Im Gegensatz zur antigenspezifischen IgE-Antikörperbildung konnten bezüglich der totalen IgE-Produktion keine genetisch bedingten Unterschiede zwischen den verschiedenen Mäusestämmen festgestellt werden.

(6) In fluoreszenzserologischen Untersuchungen konnten nach Reinfektion im Mäuseserum Antikörper (klassenunspezifisch) sowohl gegen das Larvenstadium als auch gegen adulte Würmer nachgewiesen werden (Tab. 13). Dagegen enthielten drei von 17 getesteten Seren nicht behandelter Mäuse Antikörper gegen das dritte Larvenstadium; gegen adulte Würmer gerichtete Immunglobuline konnten in den Seren nicht N.b.-infizierter Tiere nicht nachgewiesen werden.

(8) Es wurden anschließend erstmalig umfangreiche Untersuchungen über die IgE-Synthese von Mäuselymphozyten *in vitro* durchgeführt. Nach Reinfektion von Mäusen konnte der Nachweis einer antigenspezifischen IgE-Produktion gegen N.b. *in vitro* erbracht werden (Kap. D.II.2.); diese Antikörperproduktion erwies sich trotz Einsatzes der hohen Zellkonzentration von 5×10^6 Zellen/ml und einer Kulturdauer von sieben Tagen als äußerst gering.

(9) Die Produktion von totalem IgE betrug bei diesen optimalen Kulturbedingungen durchschnittlich 10 ng/ml; bei Mäusen, die in geringerem Umfang IgE bildeten, führte Bestrahlung zu einer Erhöhung der Immunglobulin-Produktion. Während nach Primärinfektion die IgE-Synthese *in vitro* nur gering erhöht war, wurde nach Sekundärinfektion eine IgE-Bildung von 15 - 25 ng/ml in der Kultur erreicht (Tab. 14).

(10) Nachdem das Kultursystem der IgE-Synthese *in vitro* etabliert war, wurde der Einfluß von verschiedenen Mitogenen (PWM, LPS, ConA) auf die IgE-Bildung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der N.b.-Infektion und der Mitogenkonzentration bei unterschiedlichen Mäusestämmen geprüft. Dabei zeigte sich (Abb. 11 bis 30, Tab. 15), daß die Zugabe von Mitogenen in erster Linie nur bei Zellen nicht N.b.-infizierter Mäuse zu einer Steigerung der IgE-Produktion führte. Den maximalen Stimulus für die IgE-Synthese *in vitro* bildete die Infektion mit N.b. *in vivo*: es war in der Regel nicht möglich, die IgE-Produktion von Zellen, die im Maximum der N.b.-Infektion entnommen wurden, durch Mitogenzugabe *in vitro* zu erhöhen. Beim Vergleich der drei verwendeten Mitogene untereinander wurde festgestellt, daß die polyklonalen B-Zell-Mitogene LPS und PWM in größerem Umfang die IgE-Produktion steigern konnten als das T-Zell-Mitogen ConA; dieses übte auch suppressiven Einfluß aus (Tab. 16).

(11) Bei der Fragestellung, ob auch parasitäre Antigene - in Form eines Homogenates bzw. Kulturüberstandes adulter Würmer verabreicht - *in vitro* Einflüsse auf die IgE-Synthese ausüben könnten, wurde festgestellt, daß die Effekte dieser Präparationen gering waren (Abb. 31 bis 37). Das gilt für die IgE-

Synthese als auch für die parallel dazu untersuchte Lymphozytenproliferation der getesteten Mäusezellen. Es zeigten sich allerdings Unterschiede bezüglich des Zeitpunktes der N.b.-Infektion, aus dem die Zellen in Kultur gebracht wurden, und der Wirkung, welche die in vitro zugefügten Antigene hatten.

(12) In den anschließenden Experimenten wurde untersucht, ob die IgE-Synthese auch in vitro durch Mäuseserum moduliert werden konnte. Es wurde demonstriert, daß Seren verschiedener Stämme konzentrationsabhängig die IgE-Produktion inhibieren konnten (Abb. 38 - 41, Tab. 17 - 20). Dabei wurden Mäuseseren von unbehandelten Tieren zusammen mit Zellen aus verschiedenen Stadien der N.b.-Infektion kultiviert. Um den/die Faktor(en) der Suppression näher zu charakterisieren, wurden Mäuseseren einer Ammoniumsulfatpräzipitation unterworfen. Daraufhin ergab sich, daß die suppressive Aktivität auf die IgE-Synthese in den 33 %- und 50 %-Präzipitaten auftrat (Abb. 43, 44; Tab. 19). Dagegen konnte die Lymphozytenproliferation der Zellen auch mit dem 70 %-Präzipitaten inhibiert werden (Tab. 20). Es wurde ferner demonstriert (Abb. 45, 46; Tab. 21 a, b), daß auch geringe Unterschiede in der suppressiven Eigenschaft zwischen den Serumpräzipitaten verschiedener Mäusestämme bestanden.

G. Literaturverzeichnis

1. Albright, J.W. & Albright, J.F.
Inhibition of murine humoral immune response by substances derived from Trypanosomiasis. J. Immunol. 126, 300 (1981).
2. Allan, W. & Mayrhofer, G.
The distribution and traffic of specific homocytotropic antibody-synthesizing cells in Nippostrongylus brasiliensis infested rats. Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci. 60, 723. (1981).
3. Altmann, A. & Katz, D.H.
Production and isolation of helper and suppressor factors. J. Immunol. Meth. 38, 9 (1980).
4. Andersson, J., Sjöberg, O. & Möller, G.
Induction of immunoglobulin and antibody synthesis in vitro by lipopolysaccharides. Eur. J. Immunol. 2, 349 (1972).
5. Ball, P.A.J. & Barlett, A.
Serological reactions to infection with Necator americanus. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 63, 362 (1969).
6. Barrett, M.E.J.
Immediate hypersensitivity to Metastrongylus spp. infection in the pig. I. The passive transfer of skin sensitivity to infected recipients. Immunology 22, 601 (1969).
7. Baxevanis, C.N., Nagy, Z.A. & Klein, J.
A novel type of T-T cell interaction removes the requirement for I-B region in the H-2 complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3809 (1981).
8. Bazin, H., Beckers, A. & Querinjean, P.
Three classes and four (sub) classes of rat immunoglobulins: IgM, IgA, IgE and IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_{2c}. Eur. J. Immunol. 4, 44 (1974).

9. Bazin, H., Beckers, A., Urbain-Vansanten, G., Pauwels, R., Bruyns, C., Tilkin, A.F., Platteau, B. & Urbain, J.
Transplantable IgD immunoglobulin-secreting tumors in rat.
J. Immunol. 121, 2077 (1978).
10. Bazin, H., Platteau, B., Beckers, A. & Pauwels, R.
Differential effect of neonatal injections of anti- μ or anti- δ antibodies on the synthesis of IgM, IgD, IgE, IgA, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, and IgG_{2c} immunoglobulin classes.
J. Immunol. 121, 2083 (1978).
11. Bazin, H., Querinjean, P., Beckers, A., Heremans, J.P. & Dessy, F.
Transplantable immunoglobulin-secreting tumors in rats.
IV. Sixty three IgE secreting immunocytoma tumors.
Immunology 26, 713 (1974).
12. Benacerraf, B. & Germain, R.N.
The immune response genes of the major histocompatibility complex. Immunol. Rev. 38, 70 (1978).
13. Benacerraf, B. & McDevitt, H.O.
Histocompatibility-linked immune response genes.
Science 175, 273 (1972).
14. Binaghi, R.A. & Benacerraf, B.
The production of anaphylactic antibody in the rat.
J. Immunol. 92, 920 (1964).
15. Bloch, K.J.
The anaphylactic antibodies of mammals including man.
Prog. Allergy 10, 84 (1967).
16. Bloch, K.J.
Reaginic and other homocytotropic antibodies. Diverse immunoglobulins with common function. In: Mechanisms in allergy, Goodfriend et al. (Hrsg.), Marcel Dekker, New York, S. 11 (1973).

17. Bloch, K.J., Ohman, J.L., Waltin, J. & Cygan, R.W.
Potentiated reagin response: initiation with minute doses of antigen and alum followed by infection with *Nippostrongylus brasiliensis*. *J. Immunol.* 110, 197 (1973).
18. Bloch, K.J., Towle, C. & Mills, J.A.
Stimulation by mitogen and metabolic antigen of DNA synthesis by mesenteric lymph node and spleen cells obtained during primary infection of rats with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Cell Immunol.* 28, 181 (1977).
19. Böttcher, J., Hämmerling, G. & Knapp, J.F.
Continuous production of monoclonal mouse IgE antibodies with human allergenic specificity by a hybrid cell line. *Nature* 275, 761 (1978).
20. Böttcher, J., Ulrich, M., Hirayama, N. & Ovary, Z.
Production of monoclonal mouse IgE antibodies with DNP specificity by hybrid cell lines. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 61, 248 (1980).
21. Bohn, A. & König, W.
Generation of monoclonal DNP-specific IgM and IgE murine antibodies on the efficacy of hybridization. *Mol. Immunol.* 19, 193 (1982 a).
22. Bohn, A. & König, W.
Generation of monoclonal murine anti-DNP-IgE, IgM and IgG₁ antibodies: biochemical and biological characterization. *Immunology* 47, 297 (1982 b).
23. Bohn, J.W., Chen, S.-S., Liu, F.-T. & Katz, D.H.
Inhibition of the induction of Fc receptors for IgE in murine lymphocytes by a complete Freund's adjuvant induced molecule. *Fed. Proc.* 41, 967 (1982).
24. Bradbury, S.M., Percey, D.H. & Strejan, G.H.
Immunology of *Ascaris suum* infection. I. Production of reagenic antibodies to worm components in rats. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 46, 498 (1974).

25. Bullock, W.W. & Möller, E.
'Spontaneous' B cell activation due to loss of normal mouse serum suppressor. *Eur. J. Immunol.* 2, 514 (1972).
26. Campbell, D.H.
Methods in Immunology. W.A. Benjamin Inc. New York (1970).
27. Campbell, G.H., Esser, K.M. & Phillips, S.M.
Parasite-(antigen) specific stimulation of B and T cells in african Trypanosomiasis. *J. Immunol.* 129, 1272 (1982).
28. Carson, D., Metzger, H. & Bloch, K.J.
Serum IgE levels during the potentiated reaginic response to egg albumin in rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. *J. Immunol.* 114, 521 (1975).
29. Charoenvit, Y., Campbell, G.H. & Tokuda, S.
Suppression of parasite antigen-specific lymphoid blastogenesis in african Trypanosomiasis. *J. Immunol.* 127, 2350 (1981).
30. Chen, S.-S., Bohn, J.W., Liu, F.-T. & Katz, D.H.
Murine lymphocytes expressing Fc receptors for IgE (Fc R_E). I. Conditions for inducing Fc R_E⁺ lymphocytes and inhibition of the inductive events by suppressive factor of allergy (SFA). *J. Immunol.* 127, 166 (1981).
31. Chiorazzi, N., Fox, D.A. & Katz, D.H.
Hapten-specific IgE antibody response in mice. VI. Selective enhancement of IgE antibody production by low dose of X-irradiation and by cyclophosphamide. *J. Immunol.* 117, 1629 (1976).
32. Chiorazzi, N., Fox, D.A. & Katz, D.H.
Hapten-specific IgE antibody response in mice. VII. Conversion of IgE 'non-responder' strains to IgE 'responder' by elimination of suppressor T cell activity. *J. Immunol.* 118, 48 (1977).

33. Chiorazzi, N., Tung, A.S., Eshhar, N. & Katz, D.H.
Hapten-specific IgE antibody responses in mice. VIII. A possible new mechanism by which anti-lymphocyte serum enhances IgE antibody synthesis in vivo. *J. Immunol.* 119, 685 (1977).
34. Chiorazzi, N., Tung, A.S. & Katz, D.H.
Induction of a ragweed-specific allergic state in Ir-gene-restricted nonresponder mice. *J. Exp. Med.* 146, 302 (1977)
35. Conrad, D.H. & Froese, A.
Characterization of the target cell receptor for IgE. II. Polyacrylamide gel analysis of the surface IgE-receptor from normal rat mast cells and from rat basophilic leukemia cells. *J. Immunol.* 116, 319 (1976).
36. Coombs, R.R.A. & Gell, P.G.H.
Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In: Clinical aspects of immunology, Gell, P.G.H., Coombs, R.P.A. & Lachmann, P.J. (Hrsg.), Blackwell publications, S. 761 (1975).
37. Crandall, C.A.
Ascaris suum: homocytotropic antibody responses in mice. *Exp. Parasitol.* 39, 69 (1976).
38. DeMacedo, M.S. & Catty, D.
Effect of X irradiation on homocytotropic and agglutinating antibody production in mice. *Immunology* 33, 611 (1977).
39. Dessaint, J., Camus, D., Fischer, E. & Capron, A.
Inhibition of lymphocyte proliferation by factor(s) produced by *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Immunol.* 7, 624 (1977)
40. Dixon, F.J. & McConahey, P.J.
Enhancement of antibody formation by whole body X-radiation. *J. Exp. Med.* 117, 833 (1963).

41. Dorf, M.E., Newburger, P.E., Hamaoka, T., Katz, D.H. & Benacerraf, B.

Characterization of an immune response gene in mice controlling IgE and IgG antibody responses to ragweed pollen extract and its 2,4-dinitrophenylated derivative. *Eur. J. Immunol.* 4, 346 (1974).

42. Dorrington, K.J. & Bennich, H.

Structure-function relationship in human immunoglobulin E. *Immunol. Rev.* 41, 1 (1978).

43. Eshhar, Z., Ofarim, M. & Waks, T.

Generation of hybridomas secretory murine reagenic antibodies of anti-DNP specificity. *J. Immunol.* 124, 775 (1980).

44. Farrar, J.L., Benjamin, W.R., Hilfiker, M.L., Howard, M., Farrar, W.L. & Fuller-Farrar, J.

The biochemistry, biology and role of Interleukin 2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody-forming B cell responses. *Immunol. Rev.* 63, 129 (1982).

45. Gorer, P.A.

The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. *Brit. J. Exp. Pathol.* 17, 42 (1936).

46. Gorer, P.A., Lyman, S. & Snell, G.D.

Studies on the genetic and antigenic basis of tumor transplantation. Linkage between a histocompatibility gene and 'fused' in mice. *Proc. R. Soc. London Ser. B*, 135, 499 (1948).

47. Hall, E., Ahlstedt, S. & Kristoffersen, A.

Boosterable IgE antibody response in mice without the use of adjuvant. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 67, 96 (1982).

48. Hamaoka, T., Katz, D.H. & Benacerraf, B.

Hapten-specific IgE antibody responses in mice. II. Cooperative interactions between adoptively transferred T and B lymphocytes in the development of IgE response. *J. Exp. Med.* 138, 538 (1973).

49. Hammer, D.K., Kirkhofen, B. & Schmid, T.
Detection of homocytotropic antibody associated with a unique immunoglobulin class in the bovine species. *Eur. J. Immunol.* 1, 249 (1971).
50. Hirashima, M., Yodoi, J., Huff, T.F. & Ishizaka, K.
Formation of IgE-binding factors by rat T lymphocytes. III. Mechanisms of selective formation of IgE-suppressive factors by treatment with complete Freund's adjuvant. *J. Immunol.* 127, 1810 (1982).
51. Hirashima, M., Yodoi, J. & Ishizaka, K.
Regulatory role of IgE-binding factors from rat T lymphocytes. III. IgE-specific suppressive factor with IgE-binding activity. *J. Immunol.* 125, 1442 (1980).
52. Hoffsten, P.F. & Dixon, F.J.
Effect of irradiation and cyclophosphamide on anti-KLH antibody formation in mice. *J. Immunol.* 112, 564 (1974).
53. Hogarth-Scott, R.S., Johansson, S.G.O. & Bennich, H.
Antibodies to *Toxocara* in the sera of visceral Larva migrans patients. The significance of raised levels of IgE. *Clin. exp. Immunol.* 5, 619 (1969).
54. Hsu, K.-H.L., Ghanta, V.K. & Hiramoto, R.N.
Immunosuppressive effect of mouse serum lipoproteins. I. In vitro studies. *J. Immunol.* 126, 1909 (1981).
55. Huff, T. & Ishizaka, K.
Formation of rat IgE binding factors by rat-mouse T cell hybridoma. *Fed. Proc.* 41, 967 (1982).
56. Ishizaka, K.
Cellular events in the IgE antibody response. *Adv. Immunol.* 23, 1 (1976).
57. Ishizaka, K.
Regulation of the IgE response. *Behring Inst. Mitt.* 68, 7 (1981).

58. Ishizaka, K. & Ishizaka, T.
Identification of E-antibodies as carrier of reaginic activity. *J. Immunol.* 99, 1187 (1967).
59. Ishizaka, K. & Ishizaka, T.
Mechanisms of reaginic hypersensitivity and IgE antibody response. *Immunol. Rev.* 41, 109 (1978).
60. Ishizaka, K., Ishizaka, T. & Hornbrook, M.M.
Physiochemical properties of human reaginic antibodies. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J. Immunol.* 97, 75 (1966).
61. Ishizaka, K., Ishizaka, T. & Hornbrook, M.M.
A unique rabbit immunoglobulin having homocytotropic antibody activity. *Immunochemistry* 7, 515 (1970).
62. Ishizaka, K., Ishizaka, T. & Lee, E.H.
Biologic function of the Fc-fragments of E-myeloma protein. *Immunochemistry* 7, 687 (1970).
63. Ishizaka, K., Ishizaka, T., Okudaira, H. & Bazin, H.
Ontogeny of IgE-bearing lymphocytes in the rat. *J. Immunol.* 120, 655 (1978).
64. Ishizaka, K., Ishizaka, T. & Tada, T.
Immunoglobulin E in the monkey. *J. Immunol.* 103, 445 (1969).
65. Ishizaka, K. & Kishimoto, T.
Regulation of antibody response in vitro. II. Formation of rabbit reaginic antibody. *J. Immunol.* 109, 65 (1972).
66. Ishizaka, K. & Okudaira, H.
Reaginic antibody formation in the mouse. II. Enhancement and suppression of anti-hapten antibody formation by priming with carrier. *J. Immunol.* 110, 1067 (1973).

67. Ishizaka, K., Okudaira, H. & King, T.P.
Immunogenic properties of modified antigen E. II. Ability of urea-denatured antigen and α -polypeptide chain to prime T cells specific for antigen E. *J. Immunol.* 114, 110 (1975).
68. Ishizaka, K., Suemura, M., Yodoi, J. & Hirashima, M.
Regulation of IgE response by IgE binding factors. *Fed. Proc.* 40, 2162 (1981).
69. Ishizaka, K., Yodoi, J., Hirashima, M. & Hirata, F.
Formation of IgE-potentiating factor and IgE-suppressive factor by rat T lymphocytes. *Fed. Proc.* 40, 964 (1981).
70. Ishizaka, T. & Ishizaka, K.
Biology of immunoglobulin E. Molecular basis of reaginic hypersensitivity. *Prog. Allergy* 19, 60 (1975).
71. Ishizaka, T., König, W., Kurata, M., Mauser, L. & Ishizaka, K.
Immunologic properties of mast cells from rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. *J. Immunol.* 115, 1078 (1975).
72. Ishizaka, T., Urban, J.F. jr. & Ishizaka, K.
IgE formation on the rat following infection with *Nippostrongylus brasiliensis*. I. Proliferation and differentiation of IgE-bearing cells. *Cell Immunol.* 22, 248 (1976).
73. Ishizaka, T., Urban, J.F. jr., Takatsu, K. & Ishizaka, K.
Immunoglobulin E synthesis in parasite infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* 58, 523 (1976).
74. Itaya, T., Okumura, K., Watanabe, N. & Ovary, Z.
Absence of correlation of Ig-1 allotype and IgE antibody suppression in SJL mice. *J. Immunol.* 120, 1758 (1978).
75. Jacobsen, R.H. & Reed, N. D.
The immune response of congenitally athymic (nude) mice to the intestinal *Nippostrongylus brasiliensis* (38 412). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 147, 667 (1974).

76. Jarrett, E.E.E.
Potentiation of reaginic (IgE) antibody to ovalbumin in the rat following sequential trematode and nematode infections. *Immunology* 22, 1099 (1972).
77. Jarrett, E.E.E.
Reaginic antibodies and helminth infection. *Vet. Rec.* 93, 480 (1973).
78. Jarrett, E.E.E.
Stimuli for the production and control of IgE in rats. *Immunol. Rev.* 41, 52 (1978).
79. Jarrett, E.E.E. & Bazin, H.
Elevation of total serum IgE in rats following helminth parasite infection. *Nature* 251, 613 (1974).
80. Jarrett, E.E.E. & Bazin, H.
Serum immunoglobulin levels in *Nippostrongylus brasiliensis* infection. *Clin. exp. Immunol.* 30, 330 (1977).
81. Jarrett, E.E.E. & Ferguson, A.
Effect of T-cell depletion on the potentiated reagin response. *Nature* 250, 420 (1974).
82. Jarrett, E.E.E., Haig, D.M. & Bazin H.
Time course studies on rat IgE production in *Nippostrongylus brasiliensis* infection. *Clin. exp. Immunol.* 24, 346 (1976).
83. Jarrett, E.E.E., Henderson, D., Riley, P. & White, R.G.
The effect of various adjuvant regimes and of nematode infection in the reaginic antibody response to egg-albumin in the rat. *Int. Archs Allergy* 42, 775 (1972).
84. Jarrett, E.E.E., Jarrett, W.F.H. & Urquhart, G.M.
Quantitative studies on the kinetics of establishment and expulsion of intestinal nematode populations in susceptible and immune hosts. *Parasitology* 58, 625 (1971).

85. Jarrett, E.E.E. & Miller, H.R.P.
Production and activities of IgE in helminth infection.
Prog. Allerg. 31, 178 (1982).
86. Jarrett, E.E.E. & Stewart, D.C.
Potentiation of rat reaginic (IgE) antibody by helminth infection. Simultaneous potentiation of separate reagents.
Immunology 23, 749 (1972).
87. Jarrett, E.E.E. & Stewart, D.C.
Potentiation of rat reaginic (IgE) antibody by *Nippostrongylus brasiliensis* infection: effect of modification of life cycle of the parasite in the host. Clin. exp. Immunol. 15, 79 (1973).
88. Jarrett, E.E.E. & Stewart, D.C.
Rat IgE production. I. Effect of dose of antigen on primary and secondary reaginic antibody responses.
Immunology 27, 365 (1974).
89. Jarrett, E.E.E. & Urquhart, G.M.
The immune response to nematode infections. Int. Rev. trop. Med. 4, 53 (1971).
90. Johansson, S.G.O. & Bennich, H.
Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin.
Immunology 13, 381 (1967).
91. Johansson, S.G.O., Bennich, H. & Berg, T.
In vitro diagnosis of atopic allergy. III. Quantitative estimation of circulating IgE antibodies by the radio allergosorbent test. Int. Archs Allergy 41, 443 (1971).
92. Johansson, S.G.O., Mellbin, T. & Vahlquist, B.
Immunoglobulin levels in Ethiopian preschool children with special reference to high concentrations of immunoglobulin E. Lancet 1, 1118 (1968).

93. Kato, K. & Yamamoto, K.
Induction of anti-DNP IgE response by DNP-coupled BCG in mice. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 69, 68 (1982).
94. Katona, I.M., Urban, J.F. jr., Scher, I. & Finkelman, F.D.
Characterization of the murine IgE response to *Nippostrongylus brasiliensis* (N.b.) infection. *Fed. Proc.* 41, 967 (1982).
95. Katz, D.H.
Control of IgE antibody production by suppressor substances. *J. Allergy Clin. Immunol.* 62, 44 (1978).
96. Katz, D.H.
Recent studies on the regulation of IgE antibody synthesis in experimental animals and man. *Immunology* 41, 1 (1980).
97. Katz, D.H.
IgE antibody responses in vitro: from rodents to man. *Prog. Allergy* 32, 105 (1982).
98. Katz, D.H., Bargatze, R.F., Bogowitz, C.A. & Katz, L.R.
Regulation of IgE antibody production by serum molecules. IV. Complete Freund's adjuvant induces both enhancing and suppressive activities detectable in the serum of low and high responder mice. *J. Immunol.* 122, 2184 (1979).
99. Katz, D.H., Bargatze, R.F., Bogowitz, C.A. & Katz, L.R.
Regulation of IgE antibody production by serum molecules. VII. The IgE-selective damping activity of suppressive factor of allergy (SFA) is exerted across both strain and species restriction barriers. *J. Immunol.* 124, 819 (1980).
100. Katz, D.H., Paul, W.E., Goidl, E.A. & Benacerraf B.
Carrier function in anti-hapten immune responses. I. Enhancement of primary and secondary anti-hapten antibody responses by carrier preimmunization. *J. Exp. Med.* 132, 261 (1970).

101. Katz, D.H. & Tung, A.S.

Regulation of IgE antibody production by serum molecules.
II. Strain-specificity of the suppressive activity of
serum from complete Freund's adjuvant-immune low responder
mouse donors. *J. Immunol.* 120, 2060 (1978).

102. Katz, D.H. & Tung, A.S.

Regulation of IgE-antibody production by serum molecules.
VI. Preliminary biochemical and immunological characterization
of serum molecules active in suppressing IgE antibody
production. *Immunopharmacology* 1, 103 (1979).

103. Kimoto, M., Kishimoto, T. Noguchi, S., Watanabe T.
& Yamamura, Y.

Regulation of antibody response in different immunoglobulin
classes. II. Induction of in vitro IgE antibody response in
murine spleen cells and demonstration of a possible
involvement of distinct T helper cells in IgE and IgG
antibody responses. *J. Immun.* 118, 840 (1977).

104. Kina, T., Nishikawa, S. & Katsura, Y.

T-cell regulation of pokeweed-mitogen-induced polyclonal
immunoglobulin production in mice. I. Characterization of
helper T-cells. *Immunology* 46, 575 (1982).

105. Kina, T., Nishikawa, S. & Katsura Y.

T-cell regulation of pokeweed-mitogen-induced polyclonal
immunoglobulin production in mice. II. Mechanism of the
induction of suppressor T-cells. *Immunology* 46, 583 (1982).

106. Kishimoto, T., Hirai, Y., Suemura, M., Nakanishi, K.
& Yamamura, Y.

Regulation of antibody responses in different immunoglo-
bulin classes. IV. Properties and functions of 'IgE-
class-specific' suppressor factor(s) released from DNP-
mycobacterium-primed T-cells. *J. Immunol.* 121, 2106 (1978).

107. Kishimoto, T., Hirai, Y., Suemura, M. & Yamamura, Y.

Regulation of antibody response in different immunoglobulin classes. I. Selective suppression of anti-DNP IgE antibody response by preadministration of DNP-coupled mycobacterium. J. Immunol. 117, 396 (1976).

108. Kishimoto, T. & Ishizaka, K.

Regulation of antibody response in vitro. III. Role of hapten-specific memory cells and carrier-specific helper cells on the distribution of anti-hapten antibodies in IgG, IgM and IgE classes. J. Immunol. 109, 612 (1972).

109. Kishimoto, T. & Ishizaka, K.

Regulation of antibody response in vitro. V. Effect of carrier-specific helper cells on generation of hapten-specific memory cells of different immunoglobulin classes. J. Immunol. 111, 1 (1973 a).

110. Kishimoto, T. & Ishizaka, K.

Regulation of antibody response in vitro. VI. Carrier-specific helper cells for IgG and IgE antibody response. J. Immunol. 111, 720 (1973 b).

111. Kishimoto, T. & Ishizaka, K.

Regulation of antibody response in vitro. VII. Enhancing soluble factors for IgG and IgE antibody response. J. Immunol. 111, 1194 (1973 c).

112. Kishimoto, T. & Ishizaka, K.

Regulation of antibody response in vitro. VIII. Multiplicity of soluble factors released from carrier-specific cells. J. Immunol. 112, 1685 (1974).

113. Kishimoto, T. & Ishizaka, K.

Immunologic and physicochemical properties of enhancing soluble factors for IgG and IgE antibody responses. J. Immunol. 114, 1177 (1975).

114. Klein, J.
Biology of the mouse histocompatibility-2 complex.
Springer Verlag, New York (1975).
115. Klein, J.
The major histocompatibility complex of the mouse.
Science 203, 516 (1979).
116. Klein, J.
Demystifying the major histocompatibility complex.
Immunology today 2, 166 (1981).
117. Klein, J.
Genetic composition of major H-2 haplotypes. Teaching
aid from the centre pages of Immunology Today 3, 4 (1982).
118. Klein, J. & Figueroa, F.
Polymorphism of the mouse H-2 loci. Immunol. Rev. 60, 23
(1981).
119. Klein, J., Flaherty L., Van de Berg, J.L. & Shreffler, D.C.
H-2 haplotypes, genes, regions and antigens: first listing.
Immunogenetics 6, 489 (1978).
120. Klein, J., Juretic, A., Baxevanis, C.N. & Nagy, Z.A.
The traditional and a new version of the mouse H-2 complex.
Nature 291, 455 (1981).
121. Klinman, N.R. & Taylor, R.B.
General methods for the study of cells and serum during
the immune response: the response to dinitrophenyl in
mice. Clin. Exp. Immunol. 4, 473 (1969).
122. Köhler, G.
Soft agar cloning of lymphoid tumor lines. Detection
of hybrid clones with anti-SRBC activity. In: Immunological
Methods, Levkovits, J. & Pernis, B. (Hrsg.), Academic
Press., S. 397 (1979).

123. Köhler, G. & Milstein, C.

Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. Eur. J. Immunol. 6, 511 (1976).

124. König, W.

Studien zur membranbiologischen Grundlage der Sensibilisierung. Habilitationsschrift, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (1977).

125. König, W. & Henn, H.W.

On the latency period of sensitization: inhibition of passive cutaneous anaphylaxis by a factor in normal rat serum. Int. Archs Allergy appl. Immun. 58, 182 (1979).

126. König, W., Henn, H.W. & Stockinger, H.

Die membranbiologische Grundlage der Sensibilisierung. Verh. Dtsch. Ges. Path. 62, 245 (1978).

127. König, W. & Ishizaka, K.

Association of receptors for mouse IgE with the plasma membrane of rat mast cells. J. Immunol. 113, 1237 (1974).

128. König, W. & Ishizaka, K.

Binding of rat IgE with the subcellular components of normal rat mast cells. Immunochemistry 13, 345 (1976).

129. König, W., Okudaira, H. & Ishizaka, K.

Specific binding of mouse IgE with rat mast cells. J. Immunol. 112, 1652 (1974).

130. König, W. & Pfeiffer, P.

Allergien: immunologische Grundlagen. Medica 2, 865 (1981).

131. König, W., Pfeiffer, P. & Pison, U.

IgE-vermittelte Entzündungsreaktionen. Dtsch. med. Wschr. 106, 1266 (1981).

132. König, W., Pfeiffer, P., Szperalski, B. & Bohn, A.
Membrane biochemical events in mast cell and basophil activation and secretion. Behring Inst. Mitt. 68, 30 (1981).
133. König, W., Theobald, K., Möller, G., Pfeiffer, P. & Bohn, A.
The IgE receptor. In: New trends in allergy, Ring, J. & Burg, G. (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York S. 21 (1981).
134. Kojima, S., Kamijo, T. & Ovary, Z.
Nonspecific enhancement of mouse antihapten IgE antibody response: involvement of a T-cell subpopulation and its product for the potentiation. Cell. Immunol. 50, 327 (1980).
135. Kojima, S. & Ovary, Z.
Effect of Nippostrongylus brasiliensis infection on anti-hapten IgE antibody response in the mouse. I. Induction of carrier specific helper cells. Cell. Immunol. 15, 274 (1975 a).
136. Kojima, S. & Ovary, Z.
Effect of Nippostrongylus brasiliensis infection on anti-hapten IgE antibody response in the mouse. II. Mechanism of potentiation of the IgE antibody response to a heterologous hapten-carrier conjugate. Cell. Immunol. 17, 383 (1975 b).
137. Kristensen, F., Walker, C., Müller, J. & DeWeck, A.L.
Evaluation of murine thymocyte stimulation using a defined culture medium. Immunobiol. 161, 429 (1982).
138. Kudo, K., Sehon, A.H. & Schwenk, R.J.
The rôle of antigen-presenting cells in the IgE antibody response. I. The induction of high titer IgE antibody responses in IgE high-responder and low-responder mice by the administration of antigen-pulsed macrophages in the absence of adjuvants. J. Immunol. 126, 403 (1981).

139. Lehrer, S.B., Vaughan, J.H. & Tan, E.M.

Adjuvant activity of the histamine-sensitizing factor of *Bordetella pertussis* in different strains of mice. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 49, 796 (1975).

140. Levine, B.B., Chang, H. & Vaz, N.M.

The production of hapten-specific reaginic antibodies in the guinea pig. *J. Immunol.* 106, 26 (1971).

141. Levine, B.B. & Vaz, N.M.

Effect of combinations of inbred strain, antigen, and antigen dose on immune responsiveness and reagin production in the mouse. A potential mouse model for immune aspects of human atopic allergy. *Int. Archs Allergy* 39, 156 (1970).

142. Lindquist, K.

A unique class of rabbit immunoglobulins eliciting passive cutaneous anaphylaxis in homologous skin. *Immunochemistry*, 5, 525 (1968).

143. Liu, F.-T., Bohn, J.W., Ferry, E.L., Yamamoto, M., Molinaro, C.A., Sherman, L.A., Klinman, N.R. & Katz, D.H.

Monoclonal dinitrophenyl-specific murine IgE antibody: preparation, isolation and characterization. *J. Immunol.* 124, 2728 (1980).

144. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J.

Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).

145. Maizels, R.M., Philipp, M. & Ogilvie, B.M.

Molecules on the surface of parasitic nematodes as probes of the immune response in infection. *Immunol. Rev.* 61, 109 (1982).

146. March, S.C., Parikh, I. & Cuatrecasas, P.

A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Anal. Biochem.* 60, 149 (1974).

147. Maron, R. & Cohen, I.R.

Mutation at H-2K locus influences susceptibility to autoimmune thyroiditis. *Nature* 279, 715 (1979).

148. Marretta, J. & Casey, F.B.

Effect of *Ascaris suum* and other adjuvants on the potentiation of the IgE response in guinea-pigs. *Immunology* 37, 609 (1979).

149. Marsh, D.G., Lichtenstein, L.M. & Norman, P.S.

Induction of IgE-mediated immediate hypersensitivity to group I Rye grass pollen allergen and allergoids in non-allergic man. *Immunology* 22, 1013 (1972).

150. McDevitt, H.O. & Benacerraf, B.

Genetic control of specific immune responses. *Adv. Immunol.* 11, 31 (1969).

151. McDevitt, H.O., Deak B.D., Shreffler, D.C., Klein, J., Stimpfling, J.K. & Snell, G.D.

Genetic control of the immune response mapping of the Ir-1 locus. *J. Exp. Med.* 135, 1259 (1972).

152. Metzger, H.

The cellular receptors for IgE. In: *Receptors and recognition, Series A, Vol. 4*, Cuatrecasas, P. & Graeves, M.F. (Hrsg.), Chapman and Hall, London, S. 75 (1977).

153. Michael, J.G. & Bernstein, J.L.

Thymus dependence of reaginic antibody formation in mice. *J. Immunol.* 111, 1600 (1973).

154. Miller, J.F.A.P. & Mitchell, G.F.

Thymus and antigen-reactive cells. *Transplant. Rev.* 1, 3 (1969).

155. Mitchell, G.F., Anders, R.F., Brown, G.V., Handman, E., Roberts-Thomson, I.C., Chapman, C.B., Forsyth, K.P., Kahl, L.P. & Cruise, K.M.

Analysis of infection characteristics and antiparasite immune responses in resistant compared with susceptible hosts. *Immunol. Rev.* 61, 137 (1982).

156. Mitchell, G.F. & Clarke, A.E.

Allergenicity of Concanavalin A in mice. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 58, 391 (1979).

157. Mitchell, G.F., Hogarth-Scott, R.S.; Edwards, R.D. & Moore, T.

Studies on immune responses to parasite antigens in mice. III. *Nippostrongylus brasiliensis* infections in hypothyroid nu/nu mice. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 52, 95 (1976).

158. Mitchison, M.A., Rajewsky, K. & Taylor, R.B.

In: Developmental aspects of antibody formation and structure, Sterzl, J. & Riha, J. (Hrsg.), Academic Press, New York, Vol. 2, S. 547 (1971).

159. Mota, I.

The mechanism of anaphylaxis. I. Production and biological properties of 'mast cell sensitizing antibodies'. *Immunology* 7, 681 (1964).

160. Mota, I.

Biological characterization of mouse 'early' antibodies. *Immunology* 12, 343 (1967).

161. Mota, I.

Tissue and cells of the immune system. In: Fundamentals of immunology, Bier, Dias da Silva, Götze & Mota (Hrsg.), Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, S. 1 (1981 a).

162. Mota, I.

Hypersensitivity, In: Fundamentals of Immunology. Bier, Dias da Silva, Götze & Mota (Hrsg.), Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, S. 257 (1981 b).

163. Mota, I. & Peixoto, J.M.

A skin sensitizing and thermolabile antibody in the mouse. Life Sci. 5, 1723 (1966).

164. Mota, I., Sadun, E.H., Bradshaw, R.M. & Gore, R.W.

The immunological response of mice infected with *Trichinella spiralis*. Biological and physico-chemical distinction of two homocytotropic antibodies. Immunology 16, 71 (1969).

165. Mota, I. & Wong, D.

Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. Life Sci. 8, 813 (1969).

166. Nelson, D.S. & Shneider, C.N.

Effect of normal mouse serum in mouse lymphocyte transformation in vitro. Eur. J. Immunol. 4, 79 (1974).

167. Neveu, P.J., Perdoux, D. & Reiss, D.

Stimulation and inhibition of mitogen-induced lymphoproliferation by serum fractions. Int. Archs Allergy appl. Immun. 69, 252 (1982).

168. Nonaka, M., Zuraw, B.L., O'Hair, C.H. & Katz, D.H.

Stimulation of primary in vitro IgE antibody responses in cultures of human peripheral mononuclear cells. J. Exp. Med. 153, 1574 (1981).

169. Ogawa, M., Kochwa, S., Smith, C., Ishizaka, K. & McIntyre, O.R.

Clinical aspects of IgE myeloma. N. Engl. J. Med. 218, 1217 (1969).

170. Ogilvie, B.M.

Reagin-like antibodies in animals immune to helminth parasites. *Nature* 204, 91 (1964).

171. Ogilvie, B.M.

Reagin-like antibodies in rats infected with the nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunology* 12, 113 (1967).

172. Ogilvie, B.M.

Nippostrongylus brasiliensis in mice: an explanation for the failure to induce worm expulsion from passively immunized animals. *Int. J. Parasitol.* 1, 161 (1971).

173. Ogilvie, B.M. & Jones, V.E.

Nippostrongylus brasiliensis - a review of immunity and the host parasite relationship in the rat. *Exp. Parasitol.* 29, 138 (1971).

174. Ogilvie, B.M. & Jones, V.E.

Immunity in the parasitic relationship between helminths and hosts. *Prog. Allergy* 17, 93 (1973).

175. Ogilvie, B.M., Love, R.J., Jarra, W. & Brown, K.N.

Nippostrongylus brasiliensis infection in rats. The cellular requirement for worm expulsion. *Immunology* 32, 521 (1977).

176. Okudaira, H. & Ishizaka, K.

Reaginic antibody formation in the mouse. II. Collaboration between hapten-specific memory cells and carrier-specific helper cells for secondary anti-hapten antibody formation. *J. Immuno.* 111, 1420 (1973).

177. Okudaira, H. & Ishizaka, K.

Reaginic antibody formation in the mouse. IV. Adoptive anti-hapten IgE antibody response in irradiated recipients of hapten-primed cells and carrier-specific cells. *J. Immunol.* 113, 563 (1974).

178. Okudaira, H., Suzuki, T. & Ogita, T.
A study of the rat passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reaction for the assay of mouse IgE antibody. J. Immunol. Meth. 33, 369 (1980).
179. Okumura, K. & Tada, T.
Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. III. Effect of thymectomy and splenectomy. J. Immunol. 106, 1019 (1971 a).
180. Okumura, K. & Tada, T.
Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. VI. Inhibitory effect of thymocytes on the homocytotropic antibody response. J. Immunol. 107, 1682 (1971 b).
181. Orr, T.S.C. & Blair, A.M.J.N.
Potentiated reagin response to egg albumin and conalbumin in Nippostrongylus brasiliensis infected rats. Life Sci. 8, 1073 (1969).
182. Orr, T.S.C., Riley, P. & Doe, J.E.
Potentiated reagin response to egg albumin in Nippostrongylus brasiliensis infected rats. I. Time course of the reagin response. Immunology 2, 195 (1971).
183. Ouchterlony, Ö.
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. I. Prog. Allergy 5, 1 (1958).
184. Ouchterlony, Ö.
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. II. Prog. Allergy 6, 30 (1962).
185. Ovary, Z.
Passive cutaneous anaphylaxis. In: Ackroyd (Hrsg.), Immunological methods, Blackwell, Oxford, S. 259 (1964).
186. Ovary, Z., Caiazza, J.S. & Kojima, S.
PCA reactions with mouse antibodies in mice and rats. Int. Archs Allergy appl. Immun. 48, 16 (1975).

187. Ovary, Z., Itaya, T. Watanabe, N. & Kojima, S.
Regulation of IgE in mice. *Immunol. Rev.* 41, 26 (1978).
188. Peeters, S.H. & Carter, B.G.
Regulation of the IgE antibody response in mice. I. Long-term production of IgE anti-ovalbumin antibody in irradiated recipients. *J. Immunol.* 121, 1596 (1978).
189. Portier, P. & Richet, C.
De l'action anaphylactique de certains venims. C. r. Séanc. Soc. Biol. 54, 170 (1902).
190. Prausnitz, C. & Küstner, H.
Studien über die Überempfindlichkeit. *Zentbl. Bakt. Parasit. Kde.* 86, 160 (1921).
191. Prouvost-Danon, A., Binaghi, R., Rochas, S. & Boussac-Aron, J.
Immunochemical identification of mouse IgE. *Immunology.* 23, 481 (1971).
192. Prouvost-Danon, A., Mouton, D., Abadie, A., Mevel, J.-C. & Biozzi, G.
Genetic regulation of IgE and agglutinating antibody synthesis in lines of mice selected for high and low immune responsiveness. *Eur. J. Immunol.* 7, 342 (1977).
193. Revoltella, R. & Ovary, Z.
Reaginic antibody production in different mouse strains. *Immunology* 17, 45 (1969 a).
194. Revoltella, R. & Ovary, Z.
Preferential production of rabbit reaginic antibodies. *Int. Archs Allergy appl. Immunol.* 36, 282 (1969 b).
195. Rivera-Ortiz, C.-J. & Nussenzweig, R.
Trichinella spiralis: anaphylactic antibody formation and susceptibility in strains of inbred mice. *Exp. Parasitol.* 39, 7 (1976).

196. Rockey, J.H. & Schwarztmann, R.M.
Skin sensitizing antibodies. A comparison study of canine and human PK and PCA antibodies and a canine myeloma protein. *J. Immunol.* 98, 1143 (1967).
197. Rosenberg, E.B., Whalen, G.E., Bennich, H. & Johansson, S.G.O.
Increased circulating IgE in a new parasitic disease-human intestinal capillariasis. *New Engl. J. Med.* 283, 1148 (1971).
198. Rousseaux-Prévost, R., Bazin, H. & Capron, A.
IgE in experimental schistosomiasis. I. Serum IgE levels after infection by *Schistosoma mansoni* in various strains of rats. *Immunology* 33, 501 (1977).
199. Rousseaux-Prévost, R., Capron, M., Bazin, H. & Capron, A.
IgE in experimental schistosomiasis. II. Quantitative determination of specific IgE antibodies against *Schistosoma mansoni*: a follow up study of two strains of infected rats. Correlation with protective immunity. *Immunology* 35, 33 (1978).
200. Rousseaux-Prévost, R., Dessaint, J.-P. & Capron, A.
Potentiated reagin response to ovalbumin in *Schistosoma mansoni* infected rats and in rats treated with a soluble metabolic product from adult worms. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 67, 187 (1982).
201. Sadun, E.H.
In: *Immunity to animal parasites*. Soulsby, E.J.L. (Hrsg.), Academic Press, S. 97 (1972).
202. Saxon, A., Morrow, C. & Stevens, R.H.
Subpopulations of circulating B cells and regulatory T cells involved in in vitro IgE production in atopic patients with elevated serum IgE. *J. Clin. Invest.* 65, 1457 (1980).

203. Saxon, A. & Stevens, R.H.

Stimulation and regulation of human IgE production in vitro using peripheral blood lymphocytes. Clin. Immunol. Immunopathol. 14, 474 (1979).

204. Seesee, F.M., Wescott, R.B. & Gorham, J.R.

Nippostrongylus brasiliensis: indirect fluorescent antibody studies of immunity in mice. Exp. Parasitol. 39, 214 (1976).

205. Sehon, A.H.

Suppression of IgE antibody response with tolerogenic conjugates of allergens and haptens. Prog. Allergy 32, 161 (1982).

206. Sherman, W.B., Stull, A. & Cooke, R.A.

Serologic changes in hay fever cases treated over a period of years. J. Allergy 11, 225 (1940).

207. Smith, C.I.E. & Hammerström, L.

Regulation of lymphocyte activation by serum factors. Int. Archs Allergy appl. Immun. 58, 219 (1979).

208. Stevens, R.H.

Immunoglobulin-bearing cells are a target for the antigen-induced inhibition of Pokeweed mitogen-stimulated antibody production. J. Immunol. 127, 968 (1981).

209. Stockinger, H.

Immunologische Parameter der parasitären Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis* in der Ratte. Dissertation, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (1979).

210. Strejan, G. & Campbell, D.H.

Hypersensitivity to *Ascaris* antigens. I. Skin-sensitizing activity of serum fractions from guinea pigs sensitized to crude extracts. J. Immunol. 98, 893 (1967).

211. Stromberg, B.E.

Potentiation of the reaginic (IgE) antibody response to ovalbumin in the guinea pig with a soluble metabolic product from *Ascaris suum*. J. Immunol. 125, 833 (1980).

212. Suemura, M. & Ishizaka, K.

Potentiation of IgE response in vitro by T cells from rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. J. Immunol. 123, 918 (1979).

213. Suemura, M., Kishimoto, T., Hirai, J. & Yamamura, J.

Regulation of antibody responses in different immunoglobulin classes. III. In vitro demonstration of 'IgE-class-specific' suppressor functions of DNP-mycobacterium-primed T cells and the soluble factor released from these cells. J. Immunol. 119, 149 (1977).

214. Suemura, M., Urban, J.F. jr. & Ishizaka, K.

Development of IgE-forming cells in vitro from rat mesenteric lymph node cells. J. Immunol. 121, 2413 (1978).

215. Suemura, M., Yodoi, J., Hirashima, M. & Ishizaka, K.

Regulatory role of IgE-binding factors from rat T lymphocytes. I. Mechanism of enhancement of IgE response by IgE-potentiating factor. J. Immunol. 125, 148 (1980).

216. Tada, T.

Regulation of reaginic antibody formation in animals. Prog. Allergy 19, 112 (1975).

217. Tada, T. & Okumura, K.

Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. I. Feed-back regulation by passively administered antibody. J. Immunol. 106, 1002 (1971 a).

218. Tada, T. & Okumura, K.

Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. V. Cell cooperation in the anti-hapten homocytotropic antibody response. J. Immunol. 107, 1137 (1971 b).

219. Tada, T., Okumura, K. & Taniguchi, M.
Cellular basis of reaginic antibody formation in the rat.
In: The biological role of immunoglobulin E system,
Ishizaka & Dayton (Hrsg.), US Government Printing
Office, Washington, S. 89 (1974).
220. Tada, T., Taniguchi, M. & Okumura, K.
Regulation of homocytotropic antibody formation in the
rat. II. Effect of X-irradiation. J. Immunol. 106, 1012
(1971).
221. Taniguchi, M. & Tada, T.
Regulation of homocytotropic antibody formation in the
rat. X. IgT-like molecule for the induction of homocyto-
tropic antibody response. J. Immunol. 113, 1757 (1974).
222. Taylor, W.A., Sheldon, D. & Francis, D.H.
IgE antibody formation in Balb/c mice without adjuvant:
induction of responses to grasspollenextract and to a
hapten-carrier conjugate. Immunology 39, 583 (1980).
223. Teale, J.M., Liu, F.-T. & Katz, D.H.
A clonal analysis of the IgE response and its implications
with regard to isotope commitment. J. Exp. Med. 153, 783
(1981).
224. Theobald, K. & König, W.
Characterization of a serum factor with inhibitory and
enhancing activity on the passive cutaneous anaphylactic
reaction. Fed. Proc. 40, 1022 (1981).
225. Tung, A.S., Chiorazzi, N. & Katz, D.H.
Regulation of IgE antibody production by serum molecules.
I. Serum from complete Freund's adjuvant-immune donors
suppresses irradiation-enhanced IgE production in low
responder mouse strains. J. Immunol. 120, 2050 (1978).
226. Turner, K.J., Feddema, L. & Quinn, E.H.
Non-specific potentiation of IgE of parasitic infections
in man. Int. Archs Allergy appl. Immun. 58, 232 (1979).

227. Uede, T., Hirata, F., Hirashima, M. & Ishizaka, K.
Role of lipomodulin in the selective formation of IgE-suppressive factors. Fed. Proc. 41, 967 (1982).
228. Unanue, E.R.
Regulatory role of macrophages in antigenic stimulation. Adv. Immunol. 15, 95 (1972).
229. Urban, J.F. jr., Ishizaka, K. & Bazin, H.
IgE-B cell generating factor from lymph node cells of rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. III. Regulation of factor formation by anti-immunoglobulin. J. Immunol. 124, 527 (1980).
230. Urban J.F. jr., Ishizaka, T. & Ishizaka, K.
IgE formation in the rat after infection with *Nippostrongylus brasiliensis*. II. Proliferation of IgE-bearing cells in neonatally thymectomized animals. J. Immunol. 118, 1982 (1977 a).
231. Urban, J.F. jr., Ishizaka, T. & Ishizaka, K.
IgE-formation in the rat following infection with *Nippostrongylus brasiliensis*. III. Soluble factor for the generating of IgE-bearing lymphocytes. J. Immunol. 119, 583 (1977 b).
232. Urban, J.F. jr., Ishizaka, T. & Ishizaka, K.
IgE-B-cell-generating factor from lymph node cells of rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. I. Source of IgE-B cell-generating factor. J. Immunol. 121, 192 (1978).
233. Vaz, E.M., Vaz, N.M. & Levine, B.B.
Persistant formation of reagins in mice injected with low doses of ovalbumin. Immunology 21, 11 (1971).

234. Vaz, N.M., DeSouza, C.M. & Sauerbronn Maia, L.C.
Genetic control of immune responsiveness in mice. *Int. Archs Allergy* 46, 275 (1974).
235. Vaz, N.M. & Levine, B.B.
Immune responses of inbred mice to repeated low doses of antigen: relationship to histocompatibility (H-2) type. *Science* 168, 852 (1970).
236. Vaz, N.M., Phillips-Quagliata, J.M., Levine, B.B. & Vaz, E.M.
H-2-linked genetic control of immune responsiveness to ovalbumin and ovomucoid. *J. Exp. Med.* 134, 1335 (1971).
237. Vaz, N.M., Vaz, E.M. & Levine, B.B.
Relationship between histocompatibility (H-2) genotype and immune responsiveness to low doses of ovalbumin in the mouse. *J. Immunol.* 104, 1572 (1970).
238. Veit, B. & Michael, J.G.
Characterization of an immunosuppressive factor present in mouse serum. *J. Immunol.* 111, 341 (1973).
239. Wakelin, D.
Genetic control of susceptibility and resistance to parasitic infection. *Adv. Parasitol.* 16, 219 (1978).
240. Waldmann, T.A.
Disorders of immunoglobulin metabolism. *New Engl. J. Med.* 281, 1170 (1969).
241. Walker S.M., Sturtevant, J.E. & Weigle, W.O.
Serum-mediated suppression of nonspecific B cell activation. I. Description of an inhibitory capacity in normal mouse serum and characterization of the inhibitory component. *J. Immunol.* 126, 1852 (1981 a).

242. Walker, S.M., Sturtevant, J.E. & Weigle, W.O.
Serum-mediated suppression of nonspecific B-cell activation.
II. Relative resistance of B cells from the NZB mouse strain
to regulation by a natural inhibitor in normal mouse serum.
J. Immunol. 127, 1204 (1981 b).
243. Warner, N.L.
Membrane immunoglobulins and antigen receptors on B and T
lymphocytes. Adv. Immunol. 19, 67 (1974).
244. Watanabe, N., Kojima, S. & Ovary, Z.
Suppression of IgE antibody production in SJL mice.
I. Nonspecific suppressor T cells. J. Exp. Med. 143,
833 (1976).
245. Watanabe, N., Kojima, S., Shen, F.-W. & Ovary, Z.
Suppression of IgE antibody production in SJL mice.
II. Expression of Ly-1 antigen on helper and nonspecific
suppressor T cells. J. Immunol. 118, 485 (1977).
246. Watanabe, N. & Ovary, Z.
Suppression of IgE antibody production in SJL mice.
III. Characterization of a suppressor substance extracted
from normal SJL spleen cells. J. Exp. Med. 145, 1501 (1977).
247. Watanabe, N. & Ovary, Z.
Enhancement of IgE antibody production in AKR mice. Int.
Archs Allergy appl. Immun. 57, 554 (1978).
248. Watanabe, T., Kimoto, M., Maruyama, S., Kishimoto, T.
& Yamamura, Y.
Regulation of antibody response in different immunoglobulin
classes. V. Establishment of T hybrid cell line secreting
IgE class-specific suppressor factor. J. Immunol. 121,
2113 (1978).
249. Wide, L., Bennich, H. & Johansson, S.G.O.
Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen
antibodies. Lancet ii, 1105 (1967).

250. Wilson, R.J.M. & Bloch, K.J.
Homocytotropic antibody response in the rat infected with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. II. Characteristics of the immune response. *J. Immunol.* 100, 622 (1968).
251. Yano, A., Kaji, R., Kojima, S. & Ovary, Z.
Immune response to *Trichomonas vaginalis*. I. Genetic regulation of IgE antibody response to *Trichomonas vaginalis* in mice. *Int. Archs Allergy appl. Immun* 67, 310 (1982).
252. Yodoi, J., Hirashima, M., Hirata, F., DeBlas, A.L. & Ishizaka, K.
Lymphocytes Bearing Fc receptors for IgE. VII. Possible participation of Phospholipase A₂ in the glycosylation of IgE-binding factors. *J. Immunol.* 127, 476 (1981).
253. Yodoi, J., Hirashima, M. & Ishizaka, K.
Regulatory role of IgE-binding factors from rat T lymphocytes. II. Glycoprotein nature and source of IgE-potentiating factor. *J. Immunol.* 125, 1436 (1980).
254. Yodoi, J. & Ishizaka, K.
Lymphocytes bearing Fc-receptors for IgE. IV. formation of IgE-binding factor by rat T lymphocytes. *J. Immunol.* 124, 1322 (1980).
255. Yodoi, J., Ishizaka, T. & Ishizaka, K.
Lymphocytes bearing Fc receptors for IgE. II. Induction of Fc ϵ -receptor bearing rat lymphocytes by IgE. *J. Immunol.* 123, 455 (1979).
256. Young, B.
Concanavalin A stimulation of mouse lymphocytes at low concentration. I. The effect of peritoneal exudate cells. *Immunology* 46, 31 (1982 a).

257. Young, B.

Concanavalin A stimulation of mouse lymphocytes at low concentration. II. The effect of conditioned medium from peritoneal exudate cells and from lymphocyte cultures. Immunology 46, 37 (1982 b).

258. Zaleski, M. & Klein, J.

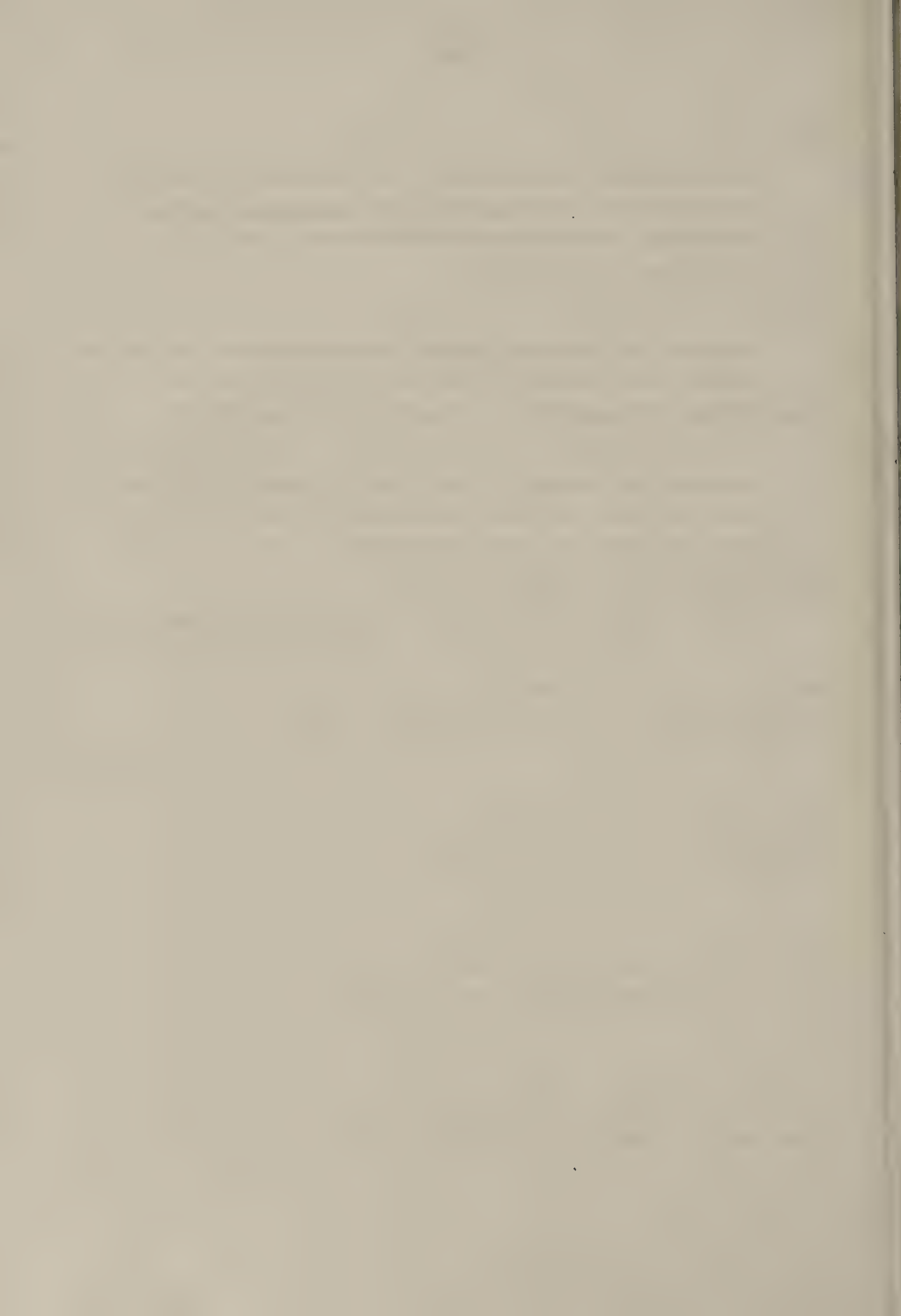
H-2 mutation affecting immune response to Thy-1.1. antigen. J. Exp. Med. 145, 1602 (1977).

259. Zuraw, B.L., Nonaka, M., O'Hair, C. & Katz, D.H.

Human IgE antibody syntheses in vitro: stimulation of IgE responses by Pokeweed mitogen and selective inhibition of such responses by human suppressive factor of allergy (SFA). J. Immunol. 127, 1169 (1981).

260. Zvaifler, N.J. & Becker, E.L.

Rabbit anaphylactic antibody. J. Exp. Med. 123, 935 (1966).



L E B E N S L A U F

- 19.04.54 Geboren in Bergneustadt (Oberberg. Kreis)
als erstes Kind des Klaus-Günther Pfeiffer
(Dipl.-Landwirt) und seiner Ehefrau
Maria-Luise, geb. Hohmann (Lehrerin)
- April 1960 Einschulung in die evang. Grundschule
Gummersbach
- April 1964 Aufnahme in das Städt. Jungengymnasium
Gummersbach
- 1967 - 1972 Besuch der Ernst-Moritz-Schule (math.-
naturw. Gymnasium) der Stadt Bonn
- 16.05.72 Ablegung der Reifeprüfung
- Aus gesundheitlichen Gründen kein Wehrdienst
(Ausmusterung: 20.06.75)
- Wintersemester Studium der Biologie an der Rheinischen
1972/73 - 78/79 Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- 15.02.79 Diplomprüfung im Fach Biologie
Hauptfach: Zoologie
1. Nebenfach: Genetik
2. Nebenfach: Physik
Titel der Diplomarbeit: Quantitative Unter-
suchungen zur Aufnahme und Verteilung von
 ^{32}P -markierter Saccharose bei Waldameisen
- 01.06.79 Beginn der Promotion im Institut für Medi-
zinische Mikrobiologie und Immunologie der
Ruhr-Universität Bochum bei Prof. Dr. König
(Direktor: Prof. Dr. Opferkuch)
- Februar 1983 Antrag auf Zulassung zur Promotion bei der
Abteilung Biologie der Ruhr-Universität
Bochum eingereicht



